

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA  
VETERINARIA



**Efecto de dos antioxidantes (Tempo y  
Tempol) en la criopreservación de  
semen ovino empleando un dilutor en  
base a Tris**

TESIS  
para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR  
Luis Felipe Ruiz García

Lima-Perú  
2005

## **DEDICATORIAS**

A mi padre, Marco Antonio Ruiz, que desde el cielo fue mi fuente de inspiración.

A mi madre, Martha García, que con su amor y su apoyo me ayudó a cumplir mis metas.

A mis hermanas y a mis tíos, porque me apoyaron incondicionalmente.

A mi alma gemela, Rocío, por estar siempre a mi lado en las buenas y las malas.

A mi universidad, a mi facultad y a mi establo.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Alexei Santiani, por darme la oportunidad de realizar mi tesis y conseguir mi título de médico veterinario.

A Rocío, por impulsarme a concluir este trabajo.

A mis asesores, por sus recomendaciones.

A los chicos de reproducción, especialmente a Antony, Katya, María y Frank.

Y a todos los que colaboraron con este trabajo.

## ÍNDICE

CONTENIDO	PÁG.
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>2. Revisión bibliográfica</b>	<b>3</b>
2.1. El semen ovino	3
2.1.1. Características del Plasma Seminal	3
2.1.2. Característica del espermatozoide ovino	5
2.1.2.1. Metabolismo de los espermatozoides	7
2.1.2.2. Procesos fisiológicos del espermatozoide indispensable para la fecundación	8
2.2. Estrés oxidativo seminal	13
2.2.1. Especies reactivas de oxígeno y su mecanismo de acción	13
2.2.3. Rol de los antioxidantes biológicos en la función espermática	17
2.3. Criopreservación de semen	21
2.3.1. Características y componentes de los dilutores para congelar semen ovino	22
2.3.2. Daños en el espermatozoide producidos durante el proceso de criopreservación	25

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1.	Valores promedios del semen ovino según diferentes autores.	3
Cuadro 2.	Valores promedios de pH y de los componentes químicos (mg/100mL) en el semen de carnero	4
Cuadro 3.	Principales lípidos en el espermatozoide ovino	6
Cuadro 4.	Porcentajes de los ácidos grasos que conforman los fosfolípidos de tres fragmentos de los espermatozoides ovinos	7
Cuadro 5.	Moléculas de colesterol y fosfolípidos y relación entre estas en la membrana plasmática e implicancia sobre la duración del proceso de capacitación de espermatozoides de diferentes mamíferos	9
Cuadro 6.	Clasificación de los antioxidantes presentes en los espermatozoides y plasma seminal según el sitio donde ejercen su acción a nivel celular	18
Cuadro 7.	Características de los antioxidantes Tempo y Tempol	29
Cuadro 8.	Efecto de la concentración de Tempo y Tempol en la motilidad progresiva de espermatozoides ovinos post-descongelamiento	38
Cuadro 9.	Efecto de la concentración de Tempo y Tempol en la viabilidad espermática e integridad del acrosoma de espermatozoides ovinos	39
Cuadro 10.	Efecto de adición de antioxidantes (0.5 mM) en la condición del acrosoma luego de la inducción de la reacción del acrosoma en espermatozoides viables de ovino luego del proceso de congelamiento-descongelamiento	41

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Representación esquemática de la cascada de la peroxidación lipídica del espermatozoide	16
Figura 2.	Interacción y sinergismo de los sistema antioxidantes de la membrana plasmática	20
Figura 3.	Producción de EROs durante el proceso de criopreservación de semen ovino	27
Figura 4.	Mecanismo antioxidante de los nitróxidos.	30

## RESUMEN

Se emplearon 32 muestras de semen procedentes de cuatro ovinos a fin de ser criopreservadas adicionándoles dos antioxidantes: Tempo (2,2,6,6 tetrametil-1-piperidiniloxil) y Tempol (4-hidroxi 2,2,6,6 tetrametil-1-piperidiniloxil), cada uno en concentración de 0.5, 1.0 y 2.5 mM. La finalidad del trabajo fue evaluar el efecto postdescongelamiento que pudiera tener sobre la motilidad progresiva, la viabilidad e integridad acrosomal, y la capacitación espermática prematura. Para cada concentración de cada antioxidante y para el grupo control, se utilizó un dilutor en base a Tris, realizándose 8 repeticiones, cada una con 4 muestras de semen. Los resultados obtenidos demuestran que la adición de Tempo a una concentración de 0.5 mM mejora significativamente la calidad del semen criopreservado en comparación con el grupo control, incrementado los porcentajes de motilidad progresiva (79 vs. 67 %), viabilidad e integridad acrosomal (70 vs. 58 %) y reduciendo la capacitación espermática prematura (9 vs. 15 %). Sin embargo, la adición de Tempol disminuyó la calidad seminal post descongelamiento en comparación con el control. Consecuentemente, el efecto de las especies reactivas de oxígeno sobre la calidad seminal puede ser reducido por la adición de Tempo 0.5 mM durante el enfriamiento. En conclusión la adición de Tempo 0.5 mM en un dilutor en base a Tris, al finalizar la fase de enfriamiento, podría constituir una estrategia para mejorar la calidad de semen ovino criopreservado y por lo tanto aumentar los porcentajes de fertilidad en la inseminación artificial en ovejas.

**Palabras claves:** Antioxidantes (Tempo y Tempol), criopreservación, semen, ovino, Tris.

## ABSTRACT

Trirty-two semen samples coming from 4 rams were frozed using 2 antioxidants, Tempo (2,2,6,6 tetramethyl-1-piperidinyloxy) and Tempol (4-hidroxi 2,2,6,6 tetramethyl-1-piperidinyloxy), each one in concentrations of 0.5, 1.0, and 2.5 mM, with the objective of evaluate their effects on post-thaw motility, viability, acrosomal integrity, and earlier sperm capacitation. It were realized 8 replication for each antioxidant concentrantion and control group, using 4 semen samples in each replication. Semen samples were diluted on a Tris extender. Results show that Tempo 0.5 mM improve frozen semen quality ( $P<0.05$ ) in comparison with control group, by increasing percentages of progresive motility (79 vs. 67 %), viability and acrosomal integrity (70 vs. 58 %), and decreasing earlier sperm capacitation (9 vs. 15 %). However, when Tempol was used, it was observed a decrease in frozed semen quality in comparison with control group. Consequently, the adverse effect of reactive oxygen species on semen quality could be reduced by the addition of Tempo 0.5 mM during the cooling process. In conclusion, the use of Tempo 0.5 mM on a Tris extender, at the end of the cooling process could be an alternative for improving the quality of frozed ram semen, and in this way, improve the fertility in artificial insemination in ewes.

**Keywords:** Antioxidants (Tempo y Tempol), criopreservation, semen, ram, Tris.



## **I. INTRODUCCION**

La inseminación artificial cervical con semen congelado tiene baja tasa de concepción en ovejas, probablemente por defectos en el transporte de los espermatozoides a través de la cervix y a una reducida viabilidad espermática post-descongelamiento. En ese sentido se ha encontrado que los espermatozoides descongelados presentan una gran proporción de capacitación prematura, lo cual reduce su tiempo de sobrevivencia en el tracto reproductivo de la oveja. Por lo tanto se requiere desarrollar un método de congelamiento que permita prevenir la pérdida de la calidad seminal durante el proceso de criopreservación.

De esta manera, el uso de antioxidantes podría constituir una alternativa para mejorar los protocolos de criopreservación de semen ovino. Dado que la membrana plasmática de los espermatozoides ovinos presenta un alto contenido de ácidos grasos insaturados, que los hacen susceptibles a sufrir peroxidación lipídica por efecto de las especies reactivas de oxígeno. La peroxidación lipídica está relacionada con la disminución en la motilidad espermática y la muerte celular. Durante el proceso de criopreservación se presenta un incremento significativo en los niveles de especies reactivas de oxígeno que también estarían produciendo la capacitación espermática prematura y la exocitosis del acrosoma. Por lo que, la adición de antioxidantes al medio de dilución podría prevenir la desestabilización temprana del espermatozoide durante el proceso de criopreservación. Consecuentemente, la adición de antioxidantes permitiría al espermatozoide criopreservado tener una mayor capacidad fecundante.

Existen algunos estudios en donde se han utilizado los análogos de la superóxido dismutasa, 2,2,6,6 tetrametil-1-piperidiniloxil (Tempo) y 4-hidroxi 2,2,6,6 tetrametil-1-piperidiniloxil (Tempol), como antioxidantes para mejorar la conservación de semen de los animales domésticos. El Tempo y Tempol han sido utilizados con la finalidad de prevenir la pérdida de motilidad y viabilidad espermática durante la refrigeración de los espermatozoides de ovino, bovino, equino y pavo. Recientemente, dichos antioxidantes también han sido utilizados en la criopreservación de semen de ovino y bovino, encontrándose resultados variables. Encontrándose en la criopreservación de semen bovino, que la adición de Tempo o Tempol a un medio en base a Tris previo al congelamiento no produce ningún efecto en la motilidad espermática y que por el contrario, cuando se utiliza leche descremada como dilutor, la motilidad disminuyó significativamente con concentraciones mayores a 0,2 mM de Tempo y Tempol. Los resultados de ese trabajo muestran que los efectos del empleo de estos antioxidantes dependen del dilutor en que se encuentren. Con respecto a la criopreservación de semen ovino, se ha encontrado que la adición de estos antioxidantes en un medio en base a leche descremada estarían previniendo parcialmente la pérdida de motilidad y viabilidad, así como reduciendo la proporción de espermatozoides capacitados prematuramente. Sin embargo, en trabajos previos realizados por el equipo de investigación de nuestro laboratorio se han encontrado mejores resultados trabajando con un medio en base a Tris en comparación con otro en base a leche descremada.

Por lo tanto el objetivo del presente trabajo es evaluar el efecto de la adición de tres concentraciones de los antioxidantes, Tempo y Tempol, sobre la calidad de semen post descongelamiento en un dilutor en base a Tris.

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 El Semen Ovino

El semen está compuesto por los espermatozoides y aquellas secreciones que derivan de los órganos accesorios del aparato reproductor, el cual es formado en el momento de la eyaculación (Garner y Hafez, 2000). En el Cuadro 1 podemos apreciar las características del semen ovino reportadas por diferentes autores.

Cuadro 1. Valores promedios del semen ovino según diferentes autores.

Autor (año)	Volumen (mL)	Concentración (millones/mL)	Motiles (%)	Vivos con acrosoma (%)
Garner y Háfez, 2000	0,8 - 1,2	2000-3000	60-80	
Asien y col., 2000			79-88	71-84
Paulenz y col., 2002	0,75 - 2,0	> 3500	> 70	
Santiani y col., 2004			80-90	83-95

#### 2.1.1 Características del Plasma Seminal

El plasma seminal está compuesta por la secreciones que proceden principalmente de la próstata y de las glándulas vesiculares y bulbouretrales (Garner y Hafez, 2000). Dichas secreciones contienen diversos componentes bioquímicos específicos que regulan diferentes funciones espermáticas (Barrios y col., 2000). En el momento de la eyaculación estas secreciones se vierten en

la uretra donde conforman una mezcla con la suspensión de espermatozoides y las secreciones ampulares del conducto deferente. En el apareamiento natural actúa como portador y protector de los espermatozoides (Garner y Hafez, 2000), siendo de suma importancia en el mantenimiento de la motilidad y la viabilidad de los espermatozoides. Además del conferirles resistencia al estrés por frío, tal como ha sido evidenciado en toros y carneros (Barrios y col., 2000).

El plasma seminal del carnero, contiene una alta concentraciones de ácido cítrico, fructosa, glicerilfosforilcolina y sorbitol (ver Cuadro 2). Asimismo, cantidades apreciables de ácido ascórbico, aminoácidos, péptidos, proteínas, lípidos, ácidos grasos y de diversas enzimas (White, 1980). Además de constituyentes antimicrobianos como plasmina seminal (Shivaji y cols., 1984), e inmunoglobulinas, principalmente inmunoglobulina A (Ablin, 1974). Asimismo, diversas sustancias hormonales como los andrógenos, estrógenos, prostaglandinas, FSH, LH, sustancia tipo gonadotropina coriónica, hormona del crecimiento, insulina, glucagón, prolactina, relaxina, hormona liberadora tiroidea y encefalinas (Mann y Lutwak-Mann, 1981).

Cuadro 2. Valores promedios de pH y de los componentes químicos (mg/100mL) en el semen de carnero (Fuente: Garner y Hafez, 2000).

<b>Componentes químicos</b>	<b>Valores</b>
pH	5.9 – 7.3
Proteína	5000
Fructosa	250
Sorbitol	26 – 170
Ácido cítrico	110 – 270
Inositol	7 – 14
Glicerilfosforilcolina	1 100 – 2 100
Sodio	178 ± 11
Potasio	84 ± 4
Calcio	6 ± 2
Magnesio	6 ± 0.8
Cloruro	86

### **2.1.2 Característica del espermatozoide ovino**

Los espermatozoides se derivan de las células germinales que están contenidas en los túbulos seminíferos de los testículos (Garner y Hafez, 2000). En el carnero, el ciclo espermatogénico dura unos 40 días. Sin embargo, cada ciclo se da a partir de las divisiones de la espermatogonia madre que suceden en diferentes momentos y a intervalos regulares de 10,5 días. Por consiguiente, constantemente suceden nuevos ciclos a partir de las diferentes células madre, lo cual asegura el abastecimiento continuo de espermatozoides. Las últimas etapas de la maduración del espermatozoide ocurren durante su paso a través del epidídimo y dura entre 10 a 14 días (Coy, 1995a). Maduración que involucra cambios en el desarrollo del potencial para adquirir la motilidad progresiva, en la modificación de sus patrones metabólicos, de la cromatina nuclear, y de la superficie de la membrana plasmática incluyendo la pérdida de la inclusión citoplasmática y el reordenamiento estructural del acrosoma.

Un espermatozoide viable, ya maduro, es en sí una célula de forma alargada, recubierta en su totalidad por la membrana plasmática y conformada por una cabeza aplanada que contiene el núcleo y una cola en la cual se genera la actividad de la motilidad celular. El extremo anterior del núcleo espermático está cubierto por el acrosoma, un delgado saco membranoso de doble capa estrechamente adherido al núcleo (Garner y Hafez, 2000).

La membrana del espermatozoide ovino se caracteriza por ser un arreglo asimétrico de moléculas dentro de una bicapa lipídica. La composición lipídica de la membrana del espermatozoide ovino es notablemente diferente de las demás de células somáticas (Martínez y Morros, 1996). El espermatozoide ovino tienen niveles muy altos de fosfolípidos y de ácidos grasos poliinsaturados y niveles muy bajos de colesterol, en comparación de otras especies, como se presenta en el Cuadro 3, adaptado de Davis (1981) y Jones y Mann (1977).

Cuadro 3. Principales lípidos presentes en el espermatozoide ovino (Adaptado de: Jones y Mann, 1977; y Davis, 1981).

<b>Componentes</b>	<b>Moléculas X10<sup>8</sup>/células</b>
Fosfolípidos	11.56
Ácidos grasos ligados a fosfolípidos	
Ácidos grasos saturados	2.77
Tetradecanoico	0.10
Hexadecanoico	1.83
Septadecanoico	Trazas
Octadecanoico	0.95
Eicosanoico	0.02
Ácidos grasos insaturados	8.79
Octadecenoico	0.43
Octadecadienoico	0.10
Octadecatrienoico	Trazas
Eicosatetraenoico	0.28
Docosahexaenoico	7.84
Colesterol	4.33

En el Cuadro 4 se presenta la distribución porcentual de los ácidos grasos ligados a fosfolípidos presentes en los diferentes fragmentos del espermatozoide ovino. Pudiéndose apreciar que en todos los fragmentos el ácido graso poliinsaturado docosahexaenoico es altamente predominantemente (Jones y Mann, 1977), por lo cual es el indicado en cumplir un rol imprescindible en la regulación de la fluidez de la membrana espermática (Martínez y Morros, 1996). Los lípidos también son muy importantes en la regulación de los cambios en la composición de las membranas plasmáticas de los espermatozoides durante los procesos de maduración en el epidídimo y de capacitación en el tracto reproductivo de la hembra (Sanocka y Kurpysz, 2004).

Cuadro 4. Porcentajes de los ácidos grasos que conforman los fosfolípidos de tres fragmentos de los espermatozoides ovinos (Fuente: Jones y Mann, 1977).

Ácidos grasos (Largo de cadena: N° de dobles enlaces)	Membrana acrosomal y plasmática	Cabezas sin membranas	Piezas medias y colas
<b>Ácidos grasos saturados</b>			
Mirístico (Tetradecanoico) (14:0)	0.9	1.0	1.2
Palmítico (Hexadecanoico) (16:0)	15.8	7.4	4.7
Septadecanoico (17:0)	Trazas	Trazas	Trazas
Esteárico (Octadecanoico) (18:0)	8.2	3.8	7.2
Araquídico (Eicosanoico) (20:0)	0.2	—	0.2
<b>Ácidos grasos insaturados</b>			
Oleico (Octadecenoico) (18:1)	3.7	1.5	3.0
Linoleico (Octadecadienoico) (18:2)	0.9	—	—
Linolénico (Octadecatrienoico) (18:3)	Trazas	—	Trazas
Araquidónico (Eicosatetraenoico) (20:4)	2.4	1.8	8.4
Cervónico (Docosahexaenoico) (22:6)	67.8	84.5	73.1

#### 2.1.2.1. Metabolismo de los espermatozoides

Las reservas intracelulares de trifosfato de adenosina (ATP) proveen la energía requerida para la motilidad espermática. La concentración endógena de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) no solo regula el empleo del ATP por el espermatozoide, sino que también tiene un efecto directo sobre la motilidad de los espermatozoides (Hoskins y Casillas, 1973).

Los espermatozoides, aunque carecen de varias de las organelas presentes en otras células, son metabólicamente activos. Ellos poseen las enzimas necesarias para realizar diversas reacciones bioquímicas, como la glucólisis (vía de Embden-Meyerhol), el ciclo del ácido tricarboxílico, la

oxidación de ácidos grasos, el transporte de electrones y posiblemente la lanzadera de monofosfato de hexosa (Mann, 1975).

Los espermatozoides degradan glucosa, fructosa o manosa a ácido láctico cuando se encuentran en condiciones anaerobias. Esta actividad fructolítica permite a esos gametos sobrevivir en las condiciones anaerobias. Esta característica es importante durante el almacenamiento de espermatozoides para su uso en inseminación artificial (Garner y Hafez, 2000).

En presencia de oxígeno los espermatozoides utilizan una variedad de sustratos. Su actividad respiratoria es la que permite emplear el lactato o el piruvato resultantes de la fructólisis de azúcares, con la producción de dióxido de carbono y agua (Mann, 1975). Esta vía oxidativa, que se localiza en las mitocondrias, es mucho más eficiente que la fructólisis para producir energía. Gran parte del ATP se emplea en el proceso consumidor de energía de la motilidad, y otra parte se destina a mantener la integridad de los procesos de transporte activo de las membranas del espermatozoide. Estos procesos de transporte activo impiden la pérdida de componentes iónicos vitales de la célula espermática (Garner y Hafez, 2000). En ausencia de sustratos exógenos, los espermatozoides utilizan sus reservas intracelulares de plasmalogeno como fuente de energía a corto plazo (White, 1980).

#### **2.1.2.2. Procesos fisiológicos del espermatozoide indispensable para la fecundación**

##### **A) Capacitación espermática**

La capacitación es un proceso dinámico y muy complejo que ocurre normalmente en el tracto reproductivo de la hembras y que incluye, cambios en la composición y por ende, en las propiedades de la membrana plasmática que le confieren al espermatozoide la capacidad de responder a los estímulos externos que desencadenan la reacción acrosomal y la subsiguiente penetración del ovocito (Vega y col 2002).

Si bien la capacitación espermática se inicia desde que el espermatozoide ingresa al útero, se produce principalmente en el istmo (Bazer



y col., 2000). Durante la capacitación del espermatozoide, parte de las proteínas séricas presente en el fluido uterino tienden a adherirse a los lípidos (Martínez y Morros, 1996), y remueven la barrera de esteroides presentes en la membrana del espermatozoide, lo cual, genera el ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior del espermatozoide (Davis, 1981). La remoción del colesterol desestabiliza la membrana del plasmática (Benoff, 1993), alterando la fluidez y permeabilidad de la membrana plasmática (Martínez y Morros, 1996).

El tiempo de duración de la capacitación está estrecha y directamente correlacionado con el contenido de colesterol y la relación entre este y el contenido total de fosfolípidos presentes en la membrana del espermatozoide, contenido y relación que tiende a variar entre especies (Davis, 1981) y que explicarían la diferencias en la capacitación espermática (ver Cuadro 5) entre estas.

Cuadro 5. Moléculas de colesterol (C) y fosfolípidos (F) y relación entre estas (C/F) en la membrana plasmática e implicancia sobre la duración del proceso de capacitación (TC) de espermatozoides de diferentes mamíferos (Fuente: Davis, 1981).

	<b>C</b>	<b>F</b>	<b>C/F</b>	<b>TC (h)</b>
	<b>Moléculas <math>\times 10^8</math>/espermatozoide</b>			
<b>Carnero</b>	4.33	11.56	0.37	1.5
<b>Verraco</b>	5.59	15.83	0.35	2
<b>Toro</b>	5.36	11.99	0.45	2
<b>Rata</b>	7.10	12.26	0.58	3.75
<b>Conejo</b>	8.47	9.67	0.88	6
<b>Hombre</b>	8.63	8.71	0.99	7

El sulfato de colesterol constituye una gran parte de la membrana acrosomal. Este estabiliza la doble capa de membranas, previniendo la disrupción de estas membranas (Martínez y Morros, 1996). La acción de las

sulfatasas sobre el sulfato de colesterol es parte del mecanismo de capacitación. La desulfatación y la remoción del colesterol incrementan la permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  y la fluidez de la membrana (Langlais y Roberts, 1985). Esto permite el cambio en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, el cual, es otro de los eventos bioquímicos que ocurren en la capacitación (Zhou y col., 1990). Las concentraciones intracelulares de  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  también cambian durante la capacitación (Darszon y col., 1999).

Durante la capacitación hay una activación de la adenil ciclasa, y un incremento del AMPc (Baldi y col., 1996). El incremento de la concentración del AMPc en el espermatozoide se produce por un incremento del ion  $\text{Ca}^{2+}$  y bicarbonato en el medio extracelular (Gerbers y col., 1982). La cinasa dependiente de AMPc son activadas con el incremento del AMPc, esta fosforiliza proteínas específicas (Guyton y Hall, 2000).

La fosforilación de tirosina se produce en la membrana de la región acrosomal del espermatozoide. Solo algunas proteínas de la membrana son fosforiladas a residuos de tirosina (Baldi y col., 1996). El incremento de la fosforilación de proteínas depende de la presencia de albúmina,  $\text{Ca}^{2+}$  y bicarbonato en el medio. La actividad de estos factores depende a la vez de la generación de AMPc (Visconti y col., 1995). En el espermatozoide de ratón la presencia de agentes quelantes de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio capacitante disminuye el incremento de la fosforilación de tirosina (Baldi y col., 1996).

Diversos estudios demuestran que la capacitación espermática es un proceso oxidativo (Aitken y col., 1996; De Lamirande y col., 1997; O'Flaherty y col., 1997; 1999; Herrero y col., 1999), ya que bajas concentraciones de especies reactivas de oxígeno exógenas o diminutas cantidades generadas por los espermatozoides son necesarias para activar este fenómeno in vitro. Además, los fluidos y las células del tracto reproductor de la hembra también pueden producir especies reactivas de oxígeno o pueden promover la formación de especies reactivas de oxígeno por los espermatozoos. El hecho que la concentración de oxígeno en estos de fluidos permanecen bajas excepto en el momento de ovulación además demuestran la relevancia fisiológica del oxígeno y de sus metabolitos en las funciones espermáticas (De Lamirande y col., 1997).

Existen evidencias que pequeñas cantidades de especies reactivas de oxígeno iniciarían el proceso de capacitación. Se ha demostrado que la presencia de anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) es necesaria para la capacitación espermática de espermatozoides (O'Flaherty y col., 1997; 1999). El rol del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) no está bien definido en el proceso de capacitación. El óxido nítrico (NO) es un radical libre de vida media relativamente larga (7 s), que también parece estar relacionado con la capacitación espermática (De Lamirande y col., 1997). El mecanismo por el cual el NO estaría acelerando la capacitación espermática parece estar relacionado a un incremento en la fosforilación de proteínas en tirosina (Herrero y col., 1999). Esto sugiere que la producción de NO es necesaria para la capacitación de espermatozoides y para permitir la respuesta a inductores de la reacción acrosomal (De Lamirande y col., 1997). También la fosforilación de tirosina es fuertemente incrementada bajo condiciones oxidativas y se reduce bajo condiciones reductoras (Aitken y col., 1996).

## **B) Hiperactivación espermática**

La hiperactivación espermática es el evento que permite que el espermatozoide encuentre al ovocito previo a la reacción acrosomal. La hiperactividad espermática se caracteriza por un movimiento flagelar marcado, el movimiento de la cabeza del espermatozoide hacia los lados y una trayectoria no lineal (Baldi y col., 1996). Los cambios en la membrana del espermatozoide durante la capacitación modifican la actividad de la cola, haciendo que tenga una potente actividad de latiguo, en lugar del débil movimiento ondulante anterior. (Guyton y Hall, 2000). Las especies reactivas de oxígeno también están relacionadas con el proceso de hiperactivación. Aparentemente, el  $O_2^{\cdot-}$  activa la NADPH oxidasa de la membrana espermática permitiendo de esta manera la hiperactivación (De Lamirande y Gagnon, 1993).

## **C) Reacción del acrosoma**

Posterior a la capacitación espermática y al encuentro del

espermatozoide con el ovocito se produce la reacción del acrosoma. (Guyton y Hall, 2000), que libera las enzimas hidrolíticas contenidas en el acrosoma (Guyton y Hall, 2000) y consiste en la vesiculación de las membranas plasmática y acrosomal externa y su posterior desaparición (Coy, 1995b).

La hialuronidasa y las enzimas proteolíticas almacenadas en grandes cantidades en el acrosoma son liberadas durante la reacción del acrosoma. A fin que la hialuronidasa actúa despolimerizando al ácido hialurónico presente en el cemento intercelular que mantiene unidas a las células del cúmulo que rodean al ovocito. A su vez, las enzimas proteolíticas, como la acrosina, actúan digiriendo a las proteínas estructurales de los tejidos que permanecen adheridos al óvulo (Mann y Lutwak-Mann, 1981; Guyton y Hall, 2000). En este sentido, la verdadera reacción del acrosoma antecede el proceso de fecundación del ovocito (Bedford, 1983). Esto difiere de la "falsa" reacción del acrosoma que ocurre durante la senescencia o degeneración de los espermatozoides (Bazer y col., 2000).

El factor inductor de la reacción del acrosoma es una glucoproteína de la zona pelúcida del óvulo, conocida como ZP3 (Vega y col., 2002). La progesterona en la matriz del cumulus puede preparar al espermatozoide para su interacción con la ZP3 antes de la reacción del acrosoma (Darszon y col., 1999). Esto se sigue por una cascada de factores de señalización en la membrana y citosol que están involucrados en la inducción de la reacción del acrosoma (Baldi y col., 1996).

La ZP3 produce el aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Darszon y col., 1999). El incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular está asociado con una salida de  $\text{H}^+$  y un incremento del pH intracelular (Baldi y col., 1996).

La presencia de especies reactivas de oxígeno también está relacionada a la reacción acrosomal (Bize y col., 1991). El mecanismo por el cual las especies reactivas de oxígeno estimulan la reacción acrosomal puede relacionarse al aumento de la fosforilación en tirosina de las proteínas espermáticas (De Lamirande y col., 1998). La peroxidación de la membrana lipídica está generalmente asociada con la disminución de la función y la viabilidad espermática, pero también tiene un efecto significativo en aumentar la habilidad del espermatozoides en la unión con zona pelúcida (De Lamirande y

col., 1997).

## **2.2. Estrés oxidativo seminal**

El estrés oxidativo seminal viene a ser el desequilibrio que se presenta entre la generación de especies reactivas de oxígeno y los mecanismos antioxidantes, que de persistir puede conducir a daño celular irreversible (Fuchs y col., 1997). Puede presentarse por una deficiencia en la generación de sustancias protectoras naturales o por una excesiva exposición a agentes generadores de especies reactivas de oxígeno (Chihuailaf y col., 2002).

Para que ocurran los procesos fisiológicos de la fertilización del ovocito son necesarias pequeñas y controladas cantidades de especies reactivas de oxígeno (De Lamirande y col., 1997). Por tanto, un desbalance entre la producción de especies reactivas de oxígeno y la presencia de agentes antioxidantes resulta en la peroxidación de los lípidos de las membranas espermáticas (Aitken y col., 1989), alterando las funciones espermáticas (Álvarez y Storey, 1989), la integridad del ADN (Aitken y col., 1998), la motilidad espermática y por consiguiente la fertilidad (Álvarez y Storey, 1989).

La producción de especies reactivas de oxígeno aumenta con el tiempo de incubación y concentración de espermatozoides (Ball y Vo, 2002), con la presencia de espermatozoides anormales (Aitken y col., 1989; Ball y col., 2001a; Ball y Vo, 2002), con poca motilidad (Aitken y Clarkson, 1988) y la presencia de leucocitos en el eyaculado (Baumber y col., 2002).

### **2.2.1. Especies reactivas de oxígeno y su mecanismo de acción**

Las especies reactivas de oxígeno son radicales libres o especies activas de oxígeno con capacidad de causar daño oxidativo (Fuchs y col., 1997; Chihuailaf y col., 2002). Entre los radicales libres de oxígeno tenemos al radical peróxido ( $\text{ROO}\cdot$ ), el hidroxilo ( $\text{OH}\cdot$ ) y al  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y como principal especie reactiva de oxígeno no radical al  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Aitken y Fisher, 1994) y además otras

de menor importancia como el ácido hipocloroso, los hidroperóxidos y los metabolitos epóxidos (Chihuailaf y col., 2002). Asimismo existen, los radicales libres derivados del nitrógeno, como el NO y el anión peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), que intervienen de manera significativa en los procesos de oxidación (Sikka, 1996).

Los radicales libres son moléculas altamente reactivas, que no necesariamente derivadas a partir del oxígeno, que tienen un corto tiempo de vida, y que presentan electrones desapareados girando en sus órbitas externas (Warren y col., 1987; Sikka, 1996). Por lo que oxidan a cualquier molécula vecina para salir de su desequilibrio, alterando su estructura y convirtiéndola en otro radical libre (Fridovich, 1998; Chihuailaf y col., 2002).

Los mecanismos celulares responsables de la generación de especies reactivas de oxígeno por los espermatozoides mamíferos aparentemente se diferencian entre especies. En bovinos y ovinos, las especies reactivas de oxígeno serían formados vía la desaminación oxidativa de aminoácidos aromáticos, la cual es responsable de la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Upreti y col., 1998). En conejos, las especies reactivas de oxígeno derivarían de la cadena de transporte de electrones a nivel mitocondrial (Aitken y Fisher, 1994). En humanos se ha demostrado que los espermatozoides estarían generando especies reactivas de oxígeno principalmente a través de dos mecanismos: el sistema NADPH oxidasa a nivel de la membrana plasmática (Aitken y col., 1992) y el NADH dependiente oxido-reductasa a nivel mitocondrial (Gavella y Lipovac, 1992).

El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producido en los espermatozoides ovinos, es descompuesto en el OH<sup>•</sup>, por la acción de los metales de transición Fe<sup>+2/+3</sup> y Cu<sup>+2+</sup>. Esta es una de las principales vías de producción del OH<sup>•</sup> en el medio celular y se conoce como reacción de Fenton. Por otra parte, la autooxidación de estos iones puede llevar a la formación de O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Chihuailaf y col., 2002).

Debido a su baja reactividad y vida media corta (1 ms), el O<sub>2</sub><sup>-</sup> no es muy dañino, aunque la reacción con sus blancos puede producir especies más tóxicas, como los radicales de tioles (De Lamirande y col., 1997). En general, el daño causado por el O<sub>2</sub><sup>-</sup>, es debido a su conversión hacia especies más

reactivas. El  $O_2^{\cdot -}$  se dismuta a  $H_2O_2$  y la subsiguiente descomposición a  $OH^{\cdot}$  serían los responsables de su efecto biológico (Fuchs y col., 1997).

El  $OH^{\cdot}$  es las especies reactivas de oxígeno más reactivas. Las concentraciones de hierro muy bajas presentes en casi cualquier solución son suficientes para catalizar la formación del  $OH^{\cdot}$  desde  $O_2^{\cdot -}$  y  $H_2O_2$  (De Lamirande y col., 1997). Su reactividad es tan grande, que cuando se forma en sistemas biológicos, los radicales reaccionan inmediatamente con cualquier molécula vecina. Por lo tanto, el  $OH^{\cdot}$  generalmente no sale de su sitio de generación y actúa causando daño molecular a los ácidos nucleicos o proteínas funcionales (Fuchs y col., 1997). Los efectos tóxicos observados tan sólo son limitados por su vida media muy corta (1 ns) (De Lamirande y col., 1997).

La mayoría de las macromoléculas que componen a los espermatozoides pueden ser oxidadas por las diferentes especies reactivas de oxígeno. Sin embargo, las biomoléculas más lábiles son los ácidos grasos poliinsaturados (Chihuilaf y col., 2002) y mas específicamente, y en especial en el espermatozoide ovino, el ácido docosahexaenoico que presenta 6 dobles enlaces, y constituye gran parte de las membranas de los espermatozoides ovinos (Jones y Mann, 1977).

La peroxidación de lípidos en los espermatozoides ovinos (ver Fig. 1) se presenta como una reacción en cadena progresiva y autoperpetuante, que se inicia por la presencia de  $OH^{\cdot}$  (Aitken y Fisher, 1994). La acción del  $OH^{\cdot}$  sobre los ácidos grasos poliinsaturados, arrebatándoles un átomo de hidrógeno en el grupo metileno que es adyacente a cada doble enlace, con los cuales forma radicales lipídicos (Sanocka y Kurpysz, 2004). Seguidamente se da el paso de la propagación, en donde rápidamente dicha molécula adiciona oxígeno y se transforma en radical peroxil lipídico que actúa como transportador de la reacción en cadena que prosiguen atacando a los demás ácidos grasos poliinsaturados y así sucesivamente se van iniciando nuevas reacciones. El mecanismo descrito se potencializa cuando existe presencia de iones de metales de transición (Chihuilaf y col., 2002; Sanocka y Kurpysz, 2004).

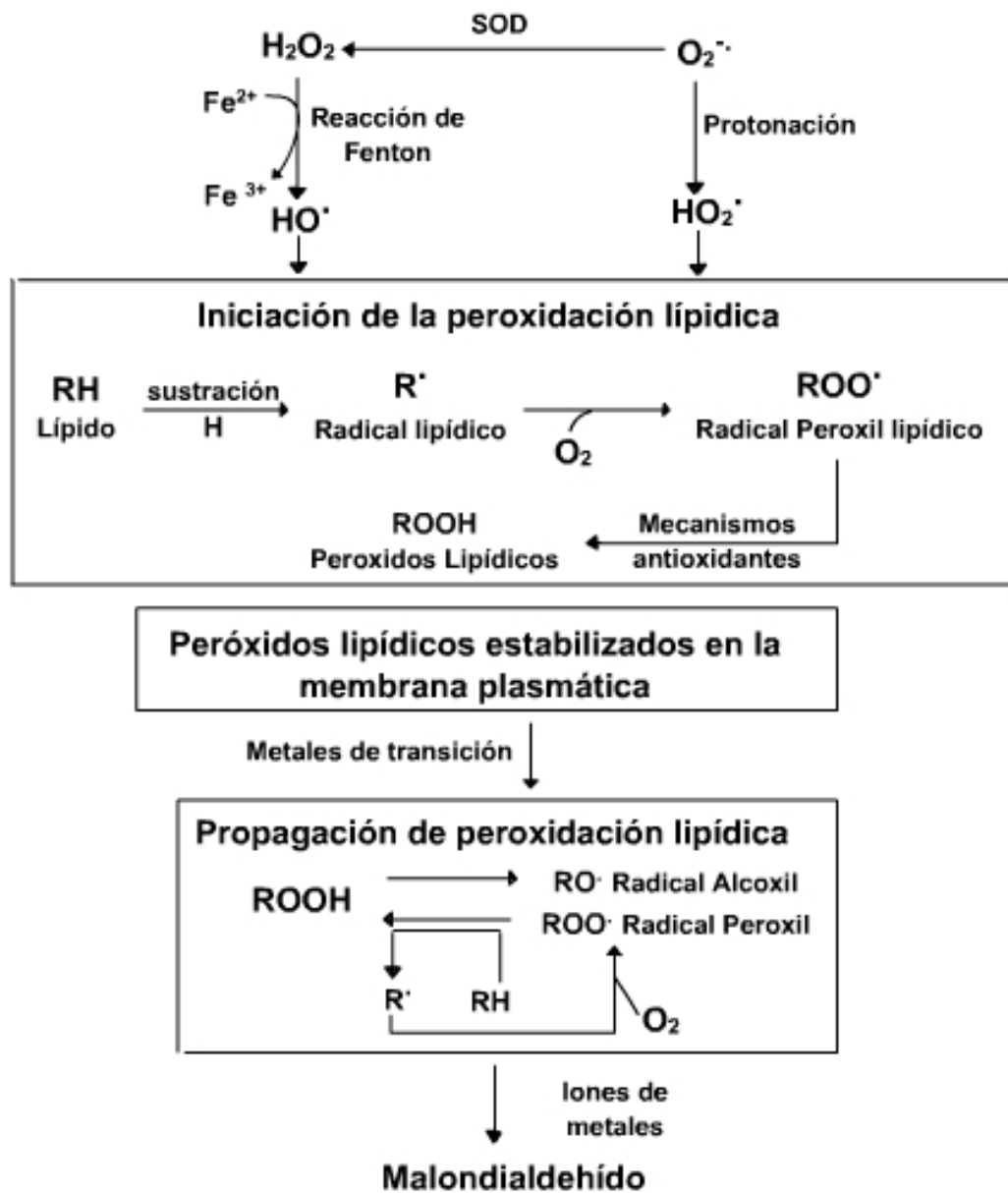


Figura 1. Representación esquemática de la cascada de la peroxidación lipídica del espermatozoide (Aitken y Fisher, 1994).

Los lípidos peroxidados al degradarse originan nuevos radicales libres y una amplia variedad de compuestos citotóxicos entre ellos los aldehídos 4-hidroxinonenal y malondialdehído, siendo este último de una baja toxicidad (Sikka, 1996). En los espermatozoides, los daños en la estructura de los ácidos grasos poliinsaturados se hacen más evidentes cuando conforman lípidos de las membranas plasmática o acrosomal, ya que se altera su cohesión, fluidez, permeabilidad y función metabólica (Chihuailaf y col., 2002).



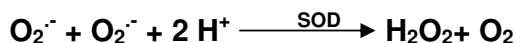
Si bien las proteínas, péptidos y aminoácidos también constituyen un blanco para las especies reactivas de oxígeno, su acción es menos dramática que frente a los lípidos, debido al lento progreso de las reacciones (Chihuailaf y col., 2002), pero el daño en una enzima importante la regulación del transporte de iones a través de la membrana plasmática del espermatozoide puede ser muy perjudicial para mantener su estabilidad (Kehrer, 1993),

El ADN, y principalmente el ADN mitocondrial, también constituyen un blanco de ataque encontrándose expuesto a un flujo constante y elevado de especies reactivas de oxígeno provenientes de la cadena respiratoria, y por carecer de histonas estructurales, lo cual le resta estabilidad (Evenson y col., 2002). En general, dentro de las alteraciones que puede sufrir el ADN se describe la oxidación de las desoxirribosas, la ruptura y entrecruzamientos de las cadenas y la modificación de bases nitrogenadas (Chihuailaf y col., 2002).

### **2.2.2 Rol de los antioxidantes biológicos en la función espermática**

En condiciones normales, tanto en el plasma seminal como en los espermatozoides, se presentan sustancias antioxidantes (ver Cuadro 6) para eliminar a las especies reactivas de oxígeno y de esta manera proteger a los espermatozoides de algún daño probable asociado con estas (Sikka, 1996; Sanocka y Kurpysz, 2004).

Los tipos de superóxido dismutasa (SOD) que se encuentran presentes en los túbulos seminíferos, espermatozoides y el plasma seminal corresponde a la formada por enzimas metaloides Cu-SOD y Zn-SOD, estos están presentes en el citosol y en el espacio intermembranoso mitocondrial (Venereo, 2002). La SOD es una metaloproteína (Sikka, 1996), su función es catalizar la dismutación del  $O_2^{\cdot -}$  a  $H_2O_2$ , lo que no requiere de cosustratos (Matés y Sánchez-Jiménez, 1999; Chihuailaf y col., 2002):

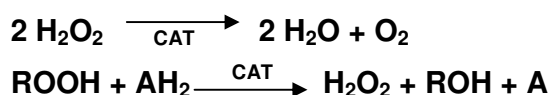


En esta reacción el  $O_2^{\cdot -}$  actúa como oxidante y como reductor. La SOD protege de esta forma a los daños del  $O_2^{\cdot -}$ , como la formación de radicales tioles (Mayes, 1997a).

Cuadro 6. Clasificación de los antioxidantes presentes en los espermatozoides y plasma seminal según el sitio donde ejercen su acción a nivel celular (Venereo, 2002).

Intracelular	Membrana	Extracelular
Superóxido dismutasa	Vitamina E	Ceruloplasmina
Catalasa	Betacarotenos	Transferrinas
Glutación peroxidasa		Vitamina C
Glutación reducido		Ácido úrico
Vitamina C		Vitamina E

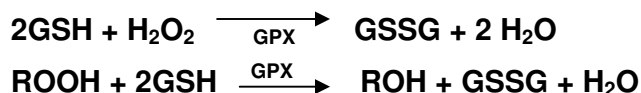
En espermatozoides de ovino, conejo y humano (Ochsendorf, 1997), y en el plasma seminal de equino (Ball y col., 2000) está presente la catalasa. La catalasa es una hemoproteína que contiene cuatro grupos hem (Mayes, 1997a). Cataliza la descomposición del  $H_2O_2$  en agua y oxígeno y reacciona con los donadores de H, como el metanol, etanol, el ácido fórmico y el fenol, usando una molécula de peróxido en un tipo de actividad del peroxidasa, de acuerdo a las siguientes reacciones (Fridovich, 1998; Matés y Sánchez-Jiménez, 1999):



Las catalasas son los antioxidantes más eficientes, dado que no puede ser saturada por altas concentraciones de  $H_2O_2$  (Matés y Sánchez-Jiménez, 1999). Las catalasas forman parte del sistema antioxidante Catalasa/SOD que actúa en presencia de altas concentraciones de  $H_2O_2$  (Venereo, 2002).

La glutación peroxidasa (GPx) se encuentra presente en los túbulos seminíferos, epidídimo y probablemente en los espermatozoides (Irvine, 1996). La actividad de la glutación peroxidasa ha sido demostrada en semen de ovinos, caninos, caprinos y humanos (Ochsendorf, 1997). La GPx es una selenoproteína que en su sitio activo contiene selenio (Se) bajo la forma de residuos de selenocisteína incorporada a una cadena polipeptídica conformada por aminoácidos (Chihuailaf y col., 2002). Actúan como una segunda línea de defensa contra la formación de peróxidos y por tanto, tienen como función el

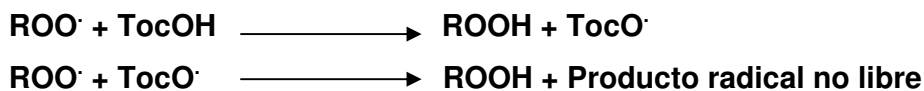
evitar que pueda propagarse la reacción en cadena (Mayes, 1997b). Este actúa en presencia de glutatión reducido (GSH), como agente reductor, reduce el  $\text{H}_2\text{O}_2$  y otros hidroperóxidos lipídicos (ROOH) en agua, y en agua y alcohol, respectivamente (Chihuailaf y col., 2002).



En general, las bajas concentraciones de peróxido de hidrógeno estimulan la actividad de peroxidasas, mientras que las altas concentraciones de peróxido son preferentemente catalizadas por la catalasa (Chihuailaf y col., 2002).

En el plasma seminal y en los espermatozoides también se ha demostrado la presencia de vitamina E ó tocoferol, de vitamina C ó ácido ascórbico, ácido úrico, transferrinas, ceruloplasminas, taurina e hipotaurina (Ochsendorf, 1997; Lewis y col., 1997).

La vitamina E ó tocoferol es el principal antioxidante liposoluble. La vitamina E captura los radicales  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{OH}^{\cdot}$  y peroxilos lipídicos en las membranas celulares y subcelulares, y detiene la propagación de la peroxidación lipídica. Se ha informado que el tocoferol resulta más eficiente contra las especies reactivas de nitrógeno. Para estabilizar un radical libre, el tocoferol se convierte en el radical libre tocoferoxilo. Afortunadamente, el tocoferoxilo retorna a su estado original a través de reacciones mediadas por la coenzima Q y en menor grado por las vitaminas C y A (Chihuailaf y col., 2002).



La vitamina C reacciona en forma directa con los radicales  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{OH}^{\cdot}$  y varios hidroperóxidos lipídicos. También actúa sobre el radical tocoferoxilo regenerándolo a vitamina E. Este proceso transforma el ascorbato en el radical libre deshidroascorbato. El retorno a su forma nativa es por acción enzimática o por sustratos celulares tiólicos. A pesar de su manifiesta propiedad antioxidante, el ascorbato puede desempeñarse como un potente prooxidante en presencia de excesivas concentraciones de iones  $\text{Fe}^{+3}$  y  $\text{Cu}^{+2}$  (Chihuailaf y col., 2002).

El ácido úrico siendo un producto terminal del metabolismo de las purinas, posee una función de antioxidante biológico, tanto intracelular como extracelular. Su mecanismo de acción aparentemente sería prevenir la oxidación de la vitamina C y también forma complejos con los metales Fe y Cu evitando que se produzca la reacción de Fenton (Chihuailaf y col., 2002).

En el semen, existe una interacción y sinergismo (ver Fig. 2) entre los sistemas antioxidantes que operan en la fase lipídica (membranas) y en la fase acuosa (citósol) (Mayes, 1997b).

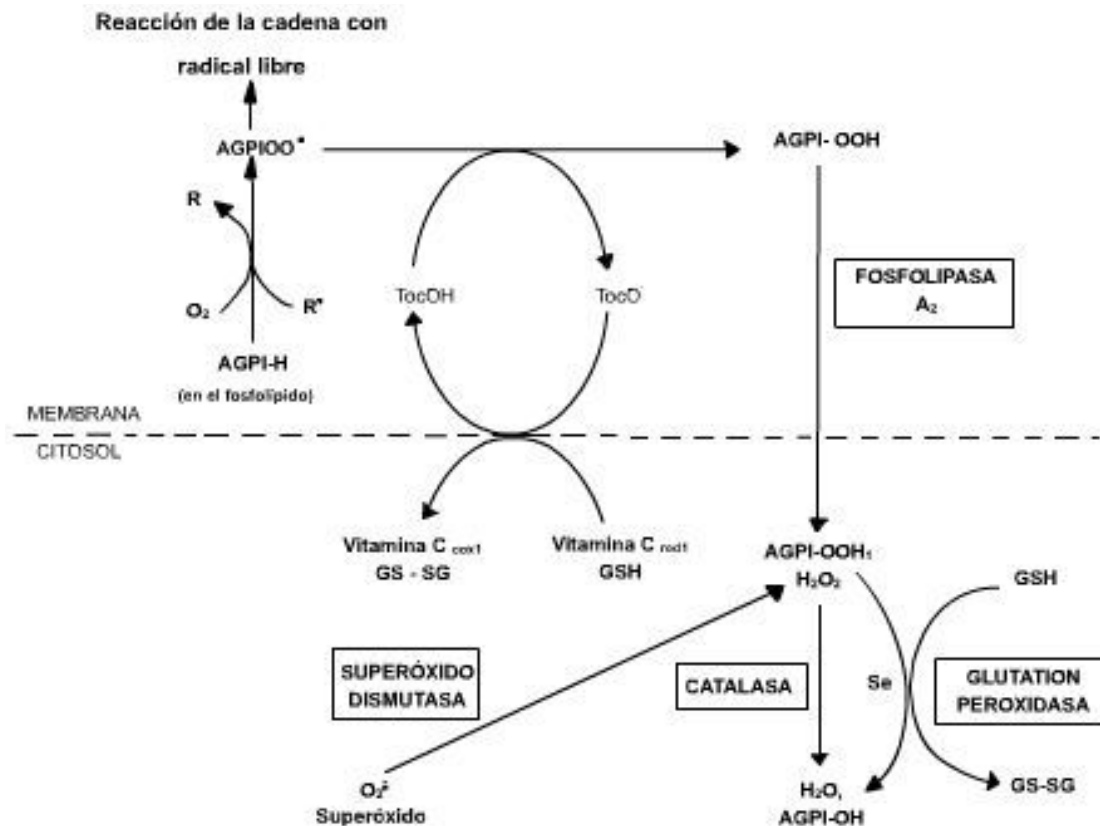


Figura 2. Interacción y sinergismo de los sistemas antioxidantes de la membrana plasmática (Mayes, 1997b).

### 2.3 Criopreservación de semen

En el carnero, al igual que en otras especies domesticas, la criopreservación de semen y la inseminación artificial permiten un rápido avance genético (Curry, 2000). Sin embargo, el daño celular es el principal impedimento para la criopreservación de semen (Quinn y col., 1969). Consecuentemente, la fertilidad obtenida con semen congelado es mucho menor a la obtenida con semen fresco (Watson, 2000).

El proceso de criopreservación de semen se realiza en una solución a la que se le ha adicionado diferentes solutos. Tanto los solutos como la concentración de los mismos proporcionan diferentes propiedades físico-químicas a los dilutores. La concentración de solutos es inversamente proporcional al punto de congelación de la solución (Vila, 1984).

El proceso de criopreservación de semen involucra 3 fases: a) Fase de enfriamiento, b) Fase de congelamiento, y c) Fase de descongelamiento (Santiani, 2003).

Durante la fase de enfriamiento la temperatura del semen diluido disminuye a 5°C. Esta fase tiene una duración que puede variar entre a 0.5 a 3 horas (Aisen y col., 2000; Molinia y col., 1994a, 1994b; Gil y col., 2003a, 2003b). En esta fase se produce una disminución de la motilidad espermática (Fiser y Fairfull, 1986) a causa de un aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (Wang y col., 1997; Santiani, 2003; Morani y col., 2004).

Las membranas celulares son las estructuras que sufren mayor daño en los procesos de criopreservación, debido a la perdida de fluidez de sus componentes lipídicos. La transición de lípidos fluidos a sólidos se presenta a temperaturas entre 10 y 16°C alterando todas las funciones de la membrana y confiriéndole un alto grado de fragilidad (Grossmann y Santaló, 1991).

Terminada la fase de enfriamiento debe haber un periodo transición. En este periodo se adicionan sustancias crioprotectoras al semen diluido (Salamon y Maxwell, 2000). Este periodo permite una estabilización de los espermatozoides en la solución. Para lo cual el semen debe ser mantenido a una temperatura de 5°C por un periodo de 0.5 a 1.5 horas (Aisen y col., 2000; Molinia y col., 1994a, 1994b; Gil y col., 2003a, 2003b). Santiani (2003) sostiene que el mantenimiento de los espermatozoides a los 5°C por periodos

prolongados incrementa el estrés oxidativo y por lo tanto la peroxidación lipídica de la membrana plasmática del espermatozoide.

La fase de congelamiento es un periodo crítico del proceso de criopreservación. Durante esta fase los espermatozoides son expuestos a un estrés de tipo osmótico y térmico (Curry y Watson, 1994; Watson, 2000). Cuando la temperatura alcanza los  $-10^{\circ}\text{C}$  se forma núcleos de hielo de agua pura en el medio extracelular (Holt, 2000). Lo que provoca un incremento progresivo en la concentración de solutos. La fracción líquida se vuelve hipertónica y en respuesta a la diferencia de gradientes de concentración, el agua del intracelular sale de la célula (Medeiros y col., 2002), lo que le permite mantener el equilibrio osmótico dentro de la suspensión (Boiso, 2001). Es en este periodo de cristalización que ocurren los principales daños en el espermatozoide ovino (Kumar y col., 2003), cuando la temperatura se encuentra entre  $-10^{\circ}\text{C}$  a  $-25^{\circ}\text{C}$  (Salamon y Maxwell, 2000).

La formación de hielo intracelular y el consecuente daño celular se puede evitar usando una velocidad de congelamiento adecuada (Mazur, 1984), la que debe ser lo suficientemente lenta para permitir que ocurra la deshidratación celular y al mismo tiempo, debe ser lo suficientemente rápida para prevenir la deshidratación excesiva (Holt, 2000).

Finalmente, la fase de descongelamiento es tan importante como la fase de congelamiento, debido a que los espermatozoides tienen que atravesar nuevamente el rango crítico de temperatura (Salamon y Maxwell, 2000).

### **2.3.1. Características y componentes de los dilutores para congelar semen ovino**

Las siguientes características deben ser cumplidas por los medios para diluir semen para el proceso de criopreservación: mantener una adecuada presión osmótica y balance electrolítico, abastecer nutrientes como fuente de energía, conservar un adecuado equilibrio del pH debido a la formación de ácido láctico, impedir el crecimiento bacteriano, extender el volumen del semen para que pueda ser usado para múltiples inseminaciones, proteger a los

espermatozoides del efecto dañino del enfriamiento y congelamiento (Háñez, 2000).

Los mejores resultados la criopreservación de semen ovino han sido conseguidos con medios con una osmolaridad entre 875 a 950 mOsm/l (Aisen y col, 1995; 2000; 2002). La membrana plasmática resiste condiciones hiperosmóticas hasta en 1000 mOsm/l, pero la membrana de los espermatozoides descongelados se altera con niveles superiores a 600 mOsm/l (Curry y Watson, 1994), por lo cual, luego del descongelamiento, los espermatozoides deben ser colocados en una solución base para su mantenimiento (Aisen y col., 2000).

La fructosa es la única azúcar presente en el plasma seminal ovino. Pero, los espermatozoides también pueden metabolizar otros monosacáridos (Garner y Háñez, 2000). Los polisacáridos como la sacarosa, trehalosa, lactosa y rafinosa solo pueden actuar extracelularmente, manteniendo la presión osmótica del diluyente y la integridad de membrana durante el congelamiento (Salamon y Maxwell, 2000).

El mantenimiento del pH incluye el uso de sustancias como el citrato, la glicina, el Tris-[hidroximetil]aminometano (Tris), el ácido cítrico, entre otros. El Tris es un compuesto alcalino que requiere estar asociado con el ácido cítrico para mantener la viabilidad espermática. El uso de Tris en concentraciones mayores a 50 mM protege a los espermatozoides de cambios de pH. Neutralizando el ácido láctico resultante del metabolismo de los espermatozoides (Salamon y Maxwell, 2000).

Para mejorar la viabilidad celular, además de una adecuada velocidad de enfriamiento y congelamiento, es necesario alterar el comportamiento físico-químico de la solución (Boiso, 2001). Para ello se añaden a los dilutores, agentes crioprotectores que disminuyen el punto congelación de la solución (García y Vila, 1984). Los crioprotectores pueden clasificarse en agentes penetrantes y no penetrantes, de acuerdo a su permeabilidad a través de la membrana celular (Boiso, 2001).

El glicerol es un agente crioprotector penetrante. Esto se debe a su bajo peso molecular que le permite atravesar la membrana. Al entrar en el espermatozoide, el glicerol reemplaza el agua intracelular. Mantiene el

volumen celular, lo que evita el colapso de los espermatozoides por una deshidratación excesiva (Medeiros y col., 2002). Al igual que otros crioprotectores penetrantes, protege al espermatozoide de las lesiones producidas por la congelación a una lenta velocidad (Boiso, 2001). El glicerol es el agente crioprotector más utilizado (Maxwell y Watson, 1996; Salamon y Maxwell, 2000) y más eficiente (Molinia y col., 1994a; Santiani, 2003; Sandoval, 2005; Sandoval y col., 2005) en la criopreservación de semen ovino. El glicerol es adicionado a los 5°C (El-Alamy y Foote, 2001; Gil y col., 2000, 2003a, 2003b), esto reduce los efectos dañinos del glicerol. El glicerol cambia la estructura bioquímica de la membrana plasmática del espermatozoide. Estos cambios están relacionados con la capacitación y la reacción del acrosoma (Watson y Martín, 1975; Salamon y Maxwell, 2000).

La trehalosa es un agente crioprotector no penetrante. Esto se debe a su alto peso molecular. La trehalosa es efectiva cuando se utilizan altas velocidades de congelación. Ejerce su acción crioprotectora promoviendo la rápida deshidratación celular y suele usarse asociada a los agentes penetrantes (Medeiros y col., 2002; Sandoval, 2005; Sandoval y col., 2005). La trehalosa interactúa con la membrana plasmática, formando puentes de hidrógeno entre sus grupos hidroxilo y los grupos fosfato de los fosfolípidos de membrana. Al reemplazar el agua alrededor de los fosfolípidos, previenen el daño a la membrana durante la deshidratación celular (De Leeuw y col., 1993; Aisen, 2000; 2002).

Otro componente importante utilizado en los dilutores para congelar semen ovino es la yema de huevo. La yema de huevo protege al espermatozoide del daño producido durante el enfriamiento y descongelamiento (Watson, 1975; Watson y Martín, 1975; Salamon y Maxwell, 2000). La fracción lipoprotéica de la yema de huevo está conformada por fosfolípidos que protegen la membrana espermática (Watson, 1981) al unirse a su superficie (Watson, 1975). De esta manera, la yema de huevo previene el daño peroxidativo (Jones y Mann, 1977). Sin embargo, la yema de huevo también es una fuente de hierro y otros metales. Estos metales pueden intensificar los efectos del  $H_2O_2$  según la reacción de Fenton (Bilodeau y col., 2002).



Además de las sustancias anteriormente mencionadas también se han adicionado otros compuestos a los medios de dilución para el congelamiento de semen ovino. El ácido etildiaminoacético (EDTA) mejora la acción crioprotectora de los disacáridos, como la lactosa, trehalosa y sacarosa, en el congelamiento de semen ovino. El EDTA es un agente quelante que previene la peroxidación de los fosfolípidos de la membrana plasmática de los espermatozoides (Salamon y Maxwell, 2000). En presencia de EDTA está reducido el papel del  $\text{Ca}^{2+}$  en la reacción del acrosoma y su interacción con los lípidos de la membrana (Aisen y col., 2000). La adición de EDTA a los diluyentes puede eliminar la acción inhibitoria del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la protección de membrana ejercida por los disacáridos, por lo que se obtiene una mayor integridad del acrosoma (Aisen y col., 2000). El EDTA confiere una alta resistencia a la pérdida motilidad espermática cuando el semen es incubado por 6 horas en ausencia o presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Esto parece indicar que el EDTA previene la reacción de Fenton (Bilodeau y col., 2002). La presencia de EDTA y la ausencia de Ca y Mg, probablemente contribuyen a mejorar la estabilidad de los cromosomas (Kusakabe y col., 2001)

### **2.3.2. Daños en el espermatozoide producidos durante el proceso de criopreservación**

Durante el proceso de criopreservación se produce diversos daños en el espermatozoide, un daño letal y un daño subletal. El daño letal, disminuye la proporción de células viables. Este daño es producido principalmente por las siguientes causas: el cambio de temperatura, el estrés tóxico y osmótico, y la formación de hielo extracelular. El daño subletal produce una disfunción en la población de células sobrevivientes. Este es principalmente producido por: la desestabilización de las membranas, y el estrés oxidativo (Watson, 2000).

En condiciones normales, entre un 40 a 50% de espermatozoides sometidos al proceso de criopreservación no sobreviven. De la proporción sobreviviente solo una minoría de espermatozoides muestra una motilidad progresiva vigorosa, presentándose en la mayoría diferentes grados de daño en la motilidad (Watson, 2000).

Después del proceso de criopreservación puede conseguirse un aceptable porcentaje de espermatozoides motiles, sólo una pequeña proporción de estos permanece sin cambios funcionales (Salamon y Maxwell, 2000). Durante el proceso de criopreservación se incrementa la capacitación espermática en comparación con espermatozoides de semen fresco (Pérez y col., 1996; Maxwell y Watson, 1996). En ovinos, el porcentaje de espermatozoides capacitados en el semen fresco varía entre 5 a 20%, mientras que en espermatozoides descongelados el porcentaje de capacitación puede llegar hasta 90% (Pérez y col., 1996), aunque varía entre 40 a 60% (Gil y col., 2000, 2003a, 2003b).

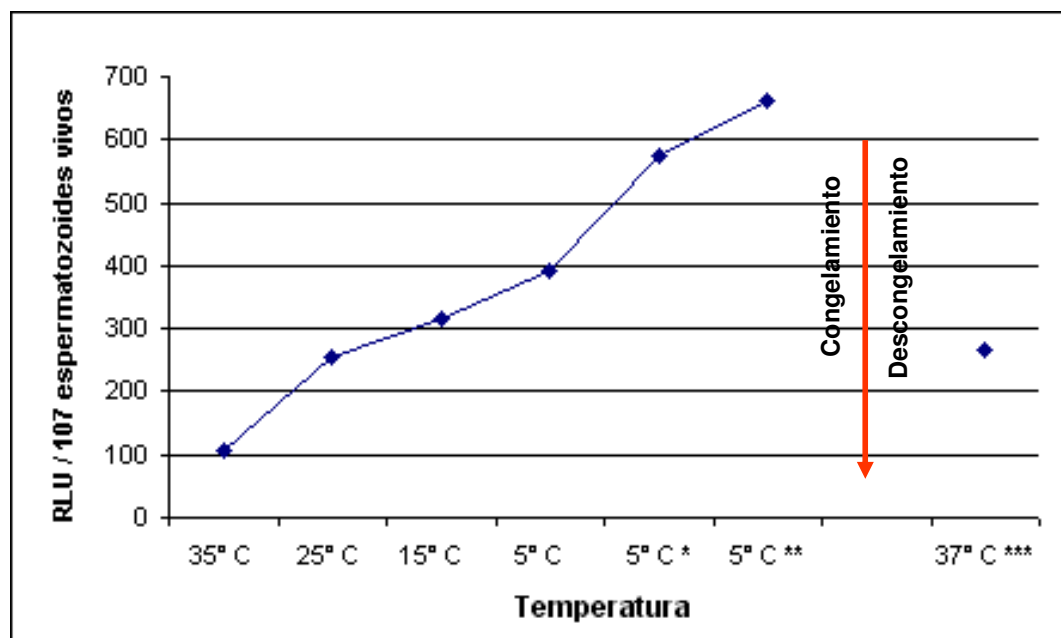
El estrés oxidativo durante el proceso de criopreservación está relacionado con la pérdida de la función espermática. Los espermatozoides criopreservados presentan disminución de la motilidad progresiva (Bell y col., 1993; Wang y col., 1997; Tselkas y col., 2000), viabilidad (Wang y col., 1997), alteración en la integridad de sus membranas (Wang y col., 1997; Tselkas y col., 2000) y daño en la estructura del ADN espermático (Baumber y col., 2003). Es por ello, que la prevención de la producción de especies reactivas de oxígeno durante el proceso de criopreservación es importante para mantener una buena calidad espermática (Santiani, 2003).

### **2.3.3. Estrés oxidativo durante el proceso de criopreservación**

Dado que durante el proceso de criopreservación el metabolismo de los espermatozoides es reducido y por ende presentan poca actividad biológica antioxidante, es de esperar que se den condiciones para un incremento de especies reactivas de oxígeno. Tal como ha sido evidenciado en la criopreservación de semen de humanos (Wang y col., 1997), ovinos (Santiani, 2003), y bovinos (Morani y col., 2004). En dichos casos, una fuente probable de para que esto se presente sería a partir de los dilutores empleados y los cuales normalmente son expuestos al aire durante su preparación y almacenamiento (Foote y col., 1993), y también porque presentan sustancias prooxidantes (Bilodeau y col., 2002).

Por lo tanto, es de esperar un aumento de las especies reactivas de oxígeno principalmente durante la fase de enfriamiento (ver Fig. 3), llegando a niveles máximos cuando el semen es mantenido a temperaturas cercanas a los 5°C por periodos prolongados (Wang y col., 1997; Santiani, 2003). Esto puede deberse a la disminución de la actividad enzimática antioxidante por el descenso de la temperatura (Álvarez y Storey, 1992; Lasso y col., 1994).

El incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno durante la fase de enfriamiento podría ser el resultado de cambios en la integridad estructural y funcional de la membrana espermática (Wang y col., 1997). El descenso de la temperatura produce cambios en el patrón de distribución de los grupos sulfhídricos de la superficie que podrían activar algunos de los mecanismos propuestos para la producción de especies reactivas de oxígeno (Chatterjee y col., 2001).



RLU: Unidades relativas de quimioluminiscencia

\* Incubado a 5°C por 30 minutos. \*\* Incubado a 5°C por 60 minutos. \*\*\* Inmediatamente descongelado

Figura 3. Producción de especies reactivas de oxígeno durante el proceso de criopreservación de semen ovino (Santiani, 2003).

Elevados niveles de peroxidación lipídica han sido observados luego del proceso de criopreservación en espermatozoides bovinos (Chatterjee y

Gagnon., 2001), humanos (Álvarez y Storey, 1992) y ovinos (Santiani, 2003). En equinos se ha observado que la peroxidación lipídica aumenta cuando son incubados a 5°C (Ball y Vo, 2002). Es probable que la peroxidación lipídica observada luego del descongelamiento haya sido causada durante el proceso de enfriamiento, particularmente en temperaturas cercanas a los 4°C, en donde se producen las mayores cantidades de especies reactivas de oxígeno (Wang y col., 1997; Saleh y Agarwal, 2002).

#### **2.3.4. Uso de antioxidantes en la criopreservación de semen**

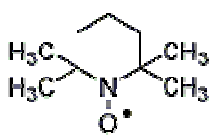
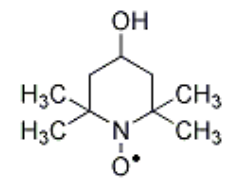
El proceso de criopreservación de semen ovino produce una disminución en la viabilidad y motilidad, y un aumento de la capacitación espermática (Gillan y col., 1997, Watson, 2000). Esto puede ser debido a que durante la criopreservación de semen se produce un incremento de las especies reactivas de oxígeno (Wang y col., 1997; Saleh y Agarwal, 2002, Santiani, 2003; Morani y col., 2004) y una disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes presentes en el semen (Álvarez y Storey, 1992; Lasso y col., 1994; Bilodeau y col., 2001).

Se han realizado diversos estudios en ovinos para determinar si la adición de antioxidantes al semen previa a la fase de congelamiento reduce el daño oxidativo causado por las especies reactivas de oxígeno (Watson y Anderson, 1983; Askari y col., 1994; Ollero y col., 1996; Sánchez-Partida y col., 1997; Aisen y col., 2000). La adición de: hidroxitolueno butilado (Watson y Anderson, 1983),  $\alpha$ -tocoferol (Askari y col., 1994; Ollero y col., 1996), lactoalbúmina, seroalbúmina (Ollero y col., 1996), taurina (Sánchez-Partida y col., 1997), EDTA (Aisen y col., 2000) y análogos de la superóxido dismutasa (Santiani, 2003) mejoran significativamente la motilidad, viabilidad e integridad de membrana luego del proceso de criopreservación. Otros antioxidantes como: ácido ascórbico (Askari y col., 1994), hipotaurina y carnosina (Sánchez-Partida y col., 1997) no mejoran la función espermática luego del proceso de criopreservación.

##### **2.3.4.1 Antioxidantes empleados en el estudio**

Mitchell y col. (1990) identificaron unas sustancias que poseían una actividad similar a la SOD. Entre estas sustancias se encuentran el 2,2,6,6 tetrametil-1-piperidiniloxil (Tempo) y el 4-hidroxi 2,2,6,6 tetrametil-1-piperidiniloxil (Tempol) (ver Cuadro 7), que son un grupo de radicales nitróxidos estables. Tienen un bajo peso molecular en comparación con la SOD, lo que les proporciona una mayor permeabilidad de membrana. También poseen una mayor vida media metabólica y son independientes de metales. Ellos protegen a las células del daño inducido por la hipoxantina/xantina oxidasa y del  $H_2O_2$ , a pesar que no exhiben actividad catalasa (Mitchell y col., 1990).

Cuadro 7. Características de los antioxidantes Tempo y Tempol

	Tempo	Tempol
Nombre	2,2,6,6 tetrametil-1-piperidiniloxil	4-hidroxi 2,2,6,6 tetrametil-1-piperidiniloxil
Fórmula química	$C_9H_{18}NO$	$C_9H_{18}NO_2$
Estructura química		
Peso molecular	156.25 g/mol	172.24 g/mol
Punto de fusión	36-38 °C	69-71 °C

Estos nitróxidos catalizan la dismutación tanto del  $O_2^{\cdot -}$  extracelular como intracelular inhibiendo el daño oxidativo (ver Fig 4). Se ha encontrado que el efecto protector de los nitróxidos no se incrementa con el aumento de su concentración, ni con la combinación con la SOD, pero se observa un efecto aditivo con la catalasa y con los quelantes de metales (Offer y col., 1998). Los nitróxidos no son consumidos durante la reacción, sino reciclados (Luo, 2001).

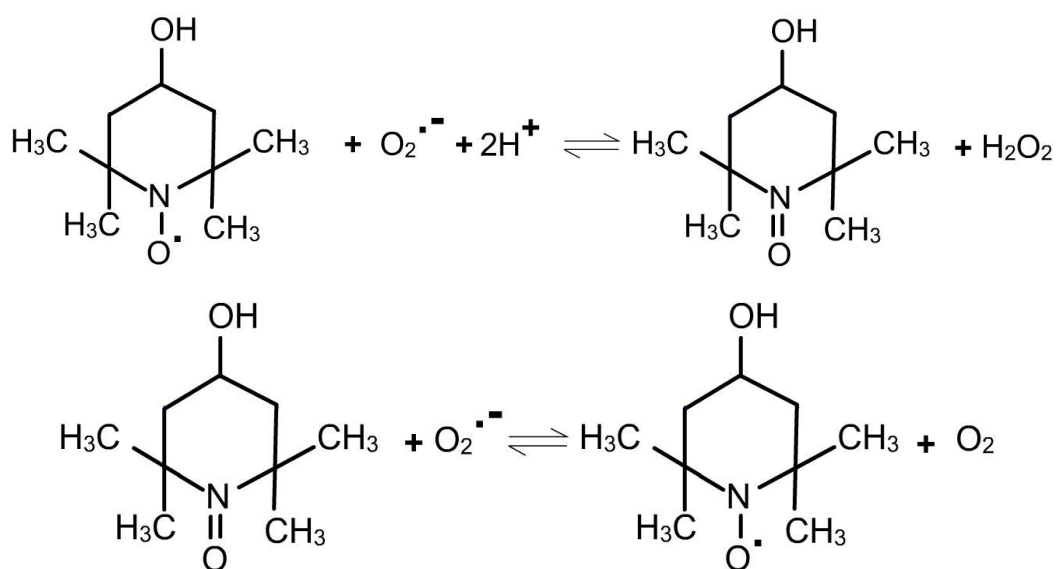


Figura 4. Mecanismo antioxidante de los nitroxidos (Luo, 2001).

Los nitroxidos también tienen otros mecanismos antioxidantes como la facilitación de la remoción del  $\text{H}_2\text{O}_2$ , la captura y reacción con los radicales alcohoxil, peroxil y radicales lipídicos y la terminación de reacciones en cadena de radicales libres (Offer y col., 1998; Luo, 2001). También pueden prevenir la producción de  $\text{OH}^\cdot$  a partir de la reacción de Fenton al oxidar Fe y Cu (Luo, 2001).

El Tempo y Tempol ha sido usados en la refrigeración de semen de pavos (Donogue y Donogue, 1997), equinos (Ball y col., 2001b) y ovinos (Mara y col., 2002) y también en la criopreservación de semen de bovinos (Foote y col., 2002) y ovinos (Santiani, 2003).

En pavos, Donogue y Donogue (1997) refrigeraron ( $5^\circ\text{C}$ ) semen con Tempo por 48 horas. Las muestras del grupo control perdieron un 50% de motilidad a las 48 horas. Sin embargo, en el grupo con Tempo, la motilidad a las 48 horas se mantuvo igual que al inicio del experimento. Del mismo modo, la integridad de la membrana espermática fue mejor en el grupo con Tempo.

En equinos, Ball y col. (2001b) estudiaron el efecto de la adición Tempo en semen equino refrigerado a  $5^\circ\text{C}$  por 72 horas. La adición de Tempo no produjo ningún efecto en la motilidad en comparación con el control.

En la refrigeración de semen ovino, Mara y col. (2002) realizaron un estudio en ovinos que indica que la adición de Tempol a un medio en base a citrato de sodio e incubado a 15°C conserva la motilidad y capacidad fecundante por un período más largo con respecto a un medio en base a leche descremada sin Tempo.

En la criopreservación de semen bovino, la adición de Tempo o Tempol a un medio en base a Tris previo al congelamiento utilizando concentraciones entre 0.2 a 2.0 mM no produce ningún efecto en la motilidad espermática. Por el contrario, cuando se utiliza leche descremada como diluyente, la motilidad disminuyó significativamente con concentraciones mayores a 0,2 mM de Tempo y Tempol (Foote y col., 2002). Los resultados de ese trabajo muestran que los efectos del empleo de estos antioxidantes dependen del dilutor en que se encuentren.

En ovinos, Santiani (2003) encontró que la adición entre 0.5 a 1 mM de Tempo a los 10 °C antes del congelamiento disminuye la producción de especies reactivas de oxígeno y la peroxidación lipídica, lo que mejora la motilidad y viabilidad espermática en un medio a base de leche descremada, mientras que la adición de Tempol no tuvo ningún efecto sobre la motilidad del semen post-descongelamiento. En recientes estudios realizados se encontraron mejores resultados al emplear un dilutor en base a Tris en comparación con otro dilutor en base a Leche descremada (Sandoval, 2005). Lo que hace interesante evaluar que efectos pueden tener estos antioxidantes en ese dilutor.

### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **3.1 Lugar de estudio y animales**

El estudio se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (FMV-UNMSM), entre los meses de octubre de 2004 a marzo de 2005. La colección de semen se realizó en el Establo de la FMV-UNMSM. Se colectaron 32 eyaculados procedentes de cuatro carneros. Las muestras de semen de los cuatro machos fueron colectadas en mismo día, una vez por semana. En total se realizaron 8 repeticiones, cada uno con cuatro muestras de semen.

#### **3.2. Procedimiento metodológico**

Se evaluó el efecto de la adición de dos antioxidantes Tempo (2,2,6,6 tetrametil-1-piperidiniloxil) y Tempol (4-hidroxi 2,2,6,6 tetrametil-1-piperidiniloxil), en tres diferentes concentraciones (0.5; 1.0; 2.5 mM) sobre la calidad del semen criopreservado, formando los siguientes grupos:

- Control
- Tempo 0.5 mM
- Tempo 1 mM
- Tempo 2.5 mM.
- Tempol 0.5 mM
- Tempol 1 mM
- Tempol 2.5 mM.



Para ello, se añadieron las concentraciones respectivas de cada antioxidante a las muestras de semen durante el proceso de enfriamiento a 10 °C. Los antioxidantes Tempo y Tempol fueron adquiridos de Aldrich (214000) y Sigma (H-8258) respectivamente.

### **3.3. Colección y evaluación del semen fresco**

El semen fue colectado utilizando una vagina artificial de ovino. Las muestras de semen fueron trasladadas inmediatamente al laboratorio para ser procesadas. Se procesaron únicamente aquellas muestras con un volumen > 0.8 mL, motilidad masal  $\geq 4$  y una concentración >  $1000 \times 10^6$  espermatozoides/mL.

La motilidad masal se evaluó mediante la observación directa de una gota de semen fresco a 100x con la ayuda de un microscopio óptico, calculándose de forma subjetiva en una escala de 0 a 5 (Ax y col., 2000).

Posteriormente se realizó el recuento de espermatozoides en una cámara de Neubauer, para esto se diluyeron 10  $\mu$ L de semen en 4 mL de agua. Finalmente los resultados se expresaron en millones de espermatozoides/mL.

### **3.4. Método de congelamiento**

En cada ensayo, se colectó semen de los 4 machos, y se procedió a mezclar todas las muestras para formar una única muestra inicial. Luego, se mezcló con la primera fracción del diluyente (1:1) previamente estabilizado a 35°C en baño maría. La primera fracción del diluyente fue preparada con tris, ácido cítrico, fructosa y 10% de yema de huevo (v/v) de acuerdo a lo descrito por Aisen y col. (2000) (Apéndice 1). El semen diluido fue colocado en un tubo falcón de 15mL y llevado a baño maría (35°C) para iniciar la curva de enfriamiento.

El enfriamiento se realizó utilizando agua fría, a una velocidad aproximada de 1 °C/3 minutos, desde los 35 °C hasta los 5 °C. El tiempo total del enfriamiento fue aproximadamente 1.5 horas. Cuando la temperatura de la muestra llegó a 10 °C, se agregaron los diferentes antioxidantes. Luego a 5°C

se agregó igual volumen de la segunda fracción del diluyente (Apéndice 1), previamente enfriado a la misma temperatura, obteniendo una concentración final de 300 a 400 millones de espermatozoides/mL y se dejó estabilizar por media hora. Terminado el periodo de estabilización, las muestras fueron envasadas con ayuda de una jeringa en pajillas de 0.5 mL.

Finalmente, las pajillas fueron congeladas con los vapores de nitrógeno líquido, para tal efecto se disminuyó la temperatura de 5 a -25 °C en un lapso de 6 minutos (5 °C/minuto) y finalmente fueron sumergidas en nitrógeno líquido (Byrne y col. 2000)

### **3.5 Evaluación del semen congelado**

El descongelamiento se realizó colocando cada pajuela en baño maría (37 °C) por 10 segundos. Luego de esto, el semen se diluyó a razón de 1 en 10 en un medio base (Apéndice 2) a 37 °C, y luego de 20 minutos se procedió a la evaluación. La evaluación del semen congelado consistió en evaluar la motilidad progresiva; la viabilidad e integridad del acrosoma y la capacitación espermática.

#### **3.5.1 Motilidad progresiva**

Luego se evaluó la motilidad progresiva, para lo cual se diluyó 5 µL de semen en 100 µL suero fisiológico temperado a 37 °C y se colocó en una lámina portaobjeto temperada aproximadamente 25 µL de la dilución anterior. La muestra fue cubierta con una lámina cubreobjeto (18 x 18 mm) y la motilidad fue observada en un microscopio óptico a 400x calculando el porcentaje de espermatozoides con movimiento hacia delante (Ax y col., 2000).

#### **3.5.2 Viabilidad e Integridad acrosomal**

La evaluación de la viabilidad e integridad acrosomal se realizó mediante la técnica de doble tinción Azul tripan y Giemsa, descrita por Didion y col. (1989). Para ello, 50 µL de semen fresco se incubaron con 50 µL de azul tripan

al 2% por 10 minutos a 37°C. Posteriormente se realizaron 2 lavados con 1 mL de PBS centrifugando a 700 g (1800 rpm) por 6 minutos. El precipitado fue resuspendido en el mismo medio. Se tomaron 10 µL de la suspensión y fueron extendidos en un portaobjetos, dejando secar a 37°C en platina temperada. Luego, la lámina fue cubierta con solución Giemsa al 20% (preparado inmediatamente antes de usar) por 40 minutos. Finalmente la lámina fue enjuagada con agua destilada y secada.

La lectura se realizó en microscopio óptico con aumento de 1000x, contando un mínimo de 200 células por lámina. Se consideraron espermatozoides vivos con acrosoma intacto los que presentaron una coloración pálida o transparente en la parte posterior a la línea ecuatorial de la cabeza y al mismo tiempo tenían el acrosoma teñido de color fucsia. Luego se procedió a calcular el porcentaje de los espermatozoides vivos con acrosoma intacto.

### **3.5.3 Capacitación espermática**

La capacitación espermática fue evaluada en forma indirecta mediante la inducción de la exocitosis acrosomal utilizando ionóforo de calcio A23187 (Sigma C-7522) (De las Heras y col., 1997), en los grupos Control y en los que se obtuvieron los mejores resultados con el uso de antioxidantes. De esta manera, las muestras fueron incubadas por 15 minutos en la presencia de 5 µM de calcio ionóforo A23187 a 37°C. Luego se realizó la técnica de doble tinción descrita anteriormente (ver 3.5.2). Los espermatozoides que presentaron su acrosoma sin teñir con Giemsa y que tenían una coloración pálida o transparente en la cabeza fueron considerados vivos sin acrosoma, son los espermatozoides reaccionados.

### **3.6. Análisis Estadístico**

El análisis de datos fue realizado utilizando el programa estadístico Prism ® versión 3,0. Se utilizó la prueba de análisis de varianza (ANOVA) para evaluar el efecto de los tratamientos con distintos antioxidantes y en diferentes concentraciones sobre los porcentajes de motilidad, integridad del acrosoma y

viabilidad espermática y capacitación espermática. La prueba de Tukey fue utilizada para determinar diferencias significativas entre los grupos (Zar, 1999).

Previamente, los porcentajes fueron transformados a valores angulares ( $\text{ángulo} = \arcsin \sqrt{\text{porcentaje}}$ ) para acercar los datos a la distribución normal.

Para uniformizar los valores iniciales del semen fresco de cada ensayo, los porcentajes de motilidad progresiva y viabilidad e integridad del acrosoma se expresaron como las proporciones entre los valores inmediatamente descongelados con los valores del semen fresco (Aisen y col., 2000; 2002).

## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

El presente estudio permitió verificar que existen diferencias entre los antioxidantes y entre los niveles de concentración empleados en cuanto al porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva, de espermatozoides vivos con acrosoma intacto y de espermatozoides capacitados. Los resultados sugieren que la adición de Tempo 0.5 mM en un dilutor Tris durante el periodo de enfriamiento previene parcialmente la pérdida de la calidad del semen ovino criopreservado.

### **4.1 Repuesta de los tratamientos sobre la motilidad progresiva post-descongelamiento.**

En relación a la motilidad progresiva post descongelamiento (ver Cuadro 8) se encontró que la adición de Tempo 0.5 mM previene parcialmente la pérdida de la motilidad progresiva post-descongelamiento y que la adición de Tempo 1.0 mM la mantuvo, sin embargo ninguna de las concentraciones utilizadas de Tempol tuvo un efecto positivo en el mantenimiento de la motilidad espermática post-descongelamiento. En ese sentido, la motilidad progresiva fue significativamente mayor ( $P<0.05$ ) en el grupo Tempo 0.5 mM en relación a los grupos Control, Tempo 1 mM y Tempo 2.5 mM. Por otro lado, en los grupos Tempol (0.5, 1.0 y 2.5

mM), los porcentajes de motilidad progresiva fueron menores a los obtenidos en el grupo Control.

Cuadro 8. Efecto de la concentración de Tempo y Tempol en la motilidad progresiva de espermatozoides ovinos post-descongelamiento

Concentración	Antioxidante	
	Tempo	Tempol
	% espermatozoides móviles	
Control	66.87 ± 4.81 <sup>b</sup>	
0.5 mM	78.91 ± 4.67 <sup>a</sup>	45.13 ± 5.68 <sup>c</sup>
1.0 mM	66.13 ± 7.95 <sup>b</sup>	34.51 ± 4.73 <sup>d</sup>
2.5 mM	48.85 ± 4.49 <sup>c</sup>	21.69 ± 5.00 <sup>e</sup>

Valores son promedios de los porcentajes ± DE. <sup>a, b, c, d, e</sup> indican diferencias significativas entre grupos (P<0.05). Valor promedio de la motilidad progresiva del semen fresco: 83.13 ± 2.67 %

Estos resultados son similares a los reportados por Santiani (2003), quien menciona que concentraciones entre 0.5 a 1.0 mM de Tempo en un medio en base a leche descremada previenen la pérdida de motilidad progresiva post-descongelamiento, mientras que la adición de Tempol no tuvo ningún efecto sobre la motilidad del semen post-descongelamiento. Por otro lado, en espermatozoides bovinos, Foote y col. (2002) señalan que ninguno de los dos antioxidantes (Tempo y Tempol), tienen efecto alguno utilizando concentraciones entre 0.2 a 2.0 mM en un medio en base a Tris, aunque utilizando Leche descremada como medio de dilución se observaron efectos negativos en la motilidad progresiva con ambos antioxidantes. Estos datos indican que podría existir diferencias entre especies y a la vez en relación al dilutor base. El resultado del presente trabajo indica que el Tempo 0.5 mM previene parcialmente los efectos dañinos de las especies reactivas de oxígeno sobre la motilidad espermática durante el proceso de criopreservación, mientras que mayores concentraciones de Tempo (2.5 mM) o la utilización de Tempol tienen efectos adversos.

## 4.2 Repuesta de los tratamientos sobre la viabilidad e integridad del acrosoma post- descongelamiento.

En relación a la viabilidad espermática e integridad del acrosoma (ver Cuadro 9), los valores obtenidos siguieron la misma tendencia descrita para la motilidad espermática, siendo significativamente mayor ( $P<0,05$ ) el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto, en el grupo Tempo 0.5 mM con respecto a los demás grupos.

Cuadro 9. Efecto de la concentración de Tempo y Tempol en la viabilidad espermática e integridad del acrosoma de espermatozoides ovinos

Concentración	Antioxidante	
	Tempo	Tempol
% espermatozoides vivos con acrosoma intacto		
Control	$58.44 \pm 5.58^b$	
0.5 mM	$69.86 \pm 6.38^a$	$40.36 \pm 5.81^c$
1.0 mM	$57.53 \pm 6.68^b$	$31.81 \pm 4.90^d$
2.5 mM	$43.80 \pm 5.03^c$	$22.69 \pm 3.63^e$

Valores son promedios de los porcentajes  $\pm$  DE. a, b, c, d, e indican diferencias significativas entre grupos ( $P<0,05$ ). Valor promedio de la viabilidad e integridad acrosomal del semen fresco:  $87.75 \pm 5.11\%$

En forma similar, Santiani (2003) encontró el mejor porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto utilizando concentraciones entre 0.5 a 1.0 mM de Tempo utilizando un dilutor en base a Leche descremada, aunque sin diferencias estadísticas. No se ha encontrado otro trabajo en ovino ni en otras especies que indique un posible efecto del Tempo y Tempol en la viabilidad de espermatozoides congelados. La disminución de la viabilidad e integridad acrosomal durante el proceso de criopreservación, estaría siendo inducido parcialmente por las especies reactivas de oxígeno producida durante el enfriamiento, como ha sido descrito en ovinos (Santiani, 2003) y otras especies como humanos (Wang y col., 1997) y bovinos (Morani y col., 2004). Por lo tanto, el

efecto de las especies reactivas de oxígeno sobre la viabilidad e integridad acrosomal estaría siendo reducido por la adición de Tempo 0.5 mM al medio de dilución durante el enfriamiento.

En relación a las diversas concentraciones de Tempo y Tempol, los mejores porcentajes de motilidad y viabilidad espermática fueron encontrados en los grupos Tempo y Tempol 0.5 mM en comparación con concentraciones mayores (1.0 y 2.5 mM). Lo que confirma que el efecto protector de los nitróxidos no aumenta con el incremento de su concentración, como ha sido descrito anteriormente (Offer y col., 1998). Por el contrario, el incremento en la concentración de estos antioxidantes se relaciona con la disminución de la motilidad y viabilidad en espermatozoides ovinos (Santiani, 2003) y bovinos (Foote y col., 2002).

#### **4.3 Repuesta de los tratamientos sobre la capacitación espermática post-descongelamiento.**

Con respecto a la capacitación espermática prematura, esta se evaluó en forma indirecta luego del descongelamiento, para esto se indujo la exocitosis acrosomal en los grupos control, Tempo 0.5 mM y Tempol 0.5 mM (ver Cuadro 10). El grupo Tempo 0.5 mM presentó un menor porcentaje ( $P < 0.05$ ) de reacción del acrosoma en comparación con los grupos control y Tempol 0.5 mM, lo que podría indicar que el Tempo previene la capacitación espermática prematura al disminuir el efecto dañino de las especies reactivas de oxígeno (De Lamirande y col., 1998). En trabajos previos se ha encontrado que la adición de diferentes antioxidantes bloquea el proceso de capacitación espermática prematura en espermatozoides de ovinos (Santiani, 2003), hámsters (Bize y col., 1993) y humanos (De Lamirande y Gagnon, 1993). Esto se produciría a través de inhibición del efecto de las especies reactivas de oxígeno sobre la fosforilación de proteínas (Aitken y col., 1995). En consecuencia, la adición de Tempo 0.5 mM también reduciría la proporción de espermatozoides que experimentan



capacitación espermática prematura por efecto de las especies reactivas de oxígeno durante la criopreservación.

Cuadro 10. Efecto de la adición de antioxidantes (0.5 mM) en la condición del acrosoma luego de la inducción de la exocitosis acrosomal en espermatozoides viables de ovino luego del proceso de congelamiento-descongelamiento.

Condición del acrosoma de los espermatozoides vivos	Grupos		
	Control	Tempo	Tempol
Acrosoma intacto	84.88 ± 3.80 <sup>b</sup>	91.50 ± 4.04 <sup>a</sup>	87.42 ± 5.18 <sup>b</sup>
Acrosoma reaccionado	15.13 ± 3.80 <sup>b</sup>	8.50 ± 4.04 <sup>a</sup>	12.58 ± 5.18 <sup>b</sup>

Valores son promedios de los porcentajes ± DE. a, b indican diferencias significativas (P<0,05) en filas.

En resumen, en el presente trabajo se demostró que la adición de un análogo de SOD a una determinada concentración tiene un efecto benéfico en la mantención de la calidad seminal durante el proceso de criopreservación de semen ovino. Este proceso ha sido relacionado con una excesiva producción de especies reactivas de oxígeno (Santiani, 2003), principalmente durante el enfriamiento. En ese sentido, Santiani (2003) encontró que la mayor producción de especies reactivas de oxígeno era a los 5°C. Es por ello, que en este presente trabajo se adicionaron los antioxidantes a los 10°C para evitar la formación de especies reactivas de oxígeno. La excesiva producción de especies reactivas de oxígeno origina la peroxidación de las membranas espermáticas (Aitken y col., 1989), lo que disminuye la motilidad (Álvarez y Storey, 1989) y viabilidad espermática (Santiani, 2003) post descongelamiento. El espermatozoide ovino es muy susceptible a la acción de las especies reactivas de oxígeno. Esto se debe a que sus membranas celulares contienen grandes cantidades de ácidos grasos poliinsaturados (Jones y Mann, 1977). Así también las membranas del espermatozoide ovino poseen menor cantidad de moléculas de colesterol que

otras especies. Por tales motivos, el espermatozoide ovino es más propenso a sufrir capacitación espermática prematura (Davis, 1981).

Tanto el Tempo como el Tempol, análogos de la SOD, también han sido utilizados en bovinos y ovinos, encontrándose en bovinos que la adición de Tempo y Tempol no previene la pérdida de la motilidad progresiva post descongelamiento (Foote y col., 2002) y en ovinos se encontró que la adición de Tempo mejora la calidad del semen criopreservado, sin embargo, el Tempol no produce mejoras (Santiani, 2003). Otros antioxidantes también han sido utilizados en ovinos encontrándose que hidroxitolueno butilado (Watson y Anderson, 1983),  $\alpha$ -tocoferol (Askari y col., 1994; Ollero y col., 1996), lactoalbúmina, seroalbúmina (Ollero y col., 1996), taurina (Sánchez-Partida y col., 1997) mejoran significativamente la motilidad, viabilidad e integridad de membrana luego del proceso de criopreservación. Sin embargo, otros antioxidantes como: ácido ascórbico (Askari y col., 1994), hipotaurina y carnosina (Sánchez-Partida y col., 1997) no mejoran la función espermática luego del proceso de criopreservación.

El mecanismo de acción de los antioxidantes empleados en este estudio, sería catalizar la dismutación del  $O_2^{\cdot -}$  en  $H_2O_2$  (Luo, 2001). El Tempo y Tempol aparentemente no tienen efecto sobre el  $H_2O_2$  (Offer y col. 1998), pero al oxidar Fe y Cu evitan la reacción de Fenton (Luo, 2001). De esta manera, estos antioxidantes evitarían la formación de  $OH^{\cdot}$  a partir del  $H_2O_2$  y por lo tanto bloquearían el inicio de la peroxidación lipídica. En nuestro estudio la adición de Tempol produjo efectos perjudiciales sobre la calidad del semen post-descongelamiento, esto puede deberse a las diferencias que existen entre las propiedades físico-químicas (ver Cuadro 7) de los antioxidantes, lo que podría provocar que estos actúen de maneras diferentes durante el proceso de criopreservación.

En conclusión, la adición de Tempo 0.5 mM al dilutor, al finalizar la fase de enfriamiento, podría constituir una estrategia para prevenir la pérdida de la calidad del semen ovino criopreservado y por lo tanto aumentar los porcentajes de fertilidad en la inseminación artificial en ovejas a nivel cervical. Sin embargo, estos resultados no aseguran el éxito, por lo que se deben realizar otros estudios.

## **V. CONCLUSIONES**

- El Tempo a una concentración de 0.5 mM, adicionado a los 10°C durante el enfriamiento, previene la pérdida de motilidad y viabilidad en espermatozoides ovinos, así como bloquean el inicio de la capacitación espermática, en un medio en base a Tris.
- La adición de Tempol a concentraciones de 0.5 mM, 1.0 mM y 2.5 mM tienen efectos desfavorables en la calidad seminal post-descongelamiento en un medio en base a Tris.
- La adición de Tempo a una concentración de 1.0 mM no tiene efectos sobre la calidad seminal post-descongelamiento, pero su incremento a 2.5 mM tiene efectos perjudiciales.

## VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ablin, R. (1974). Immunologic properties of sex accessory tissue components. En: Male Accessory Sex Organs. D. Brandes (ed.). New York, Academic Press.
- Aisen, E.; Álvarez, H.; Venturino, A. y Garde, J. (2000) Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. Theriogenology 53, 1053-1061.
- Aisen, E.; Álvarez, H.; Venturino, A. y Larreguy, D. (1995) Efecto comparativo de los diluyoconservadores de diferente composición y tonicidad sobre la criopreservación de semen ovino. Investigación Agraria: Producción y Sanidad Animal. 10, 223-231.
- Aisen, E.; Medina, V. y Venturino, A. (2002) Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. Theriogenology. 57, 1801-1808.
- Aitken, R. y Clarkson, J. (1988) Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. J Androl. 9, 367-376.
- Aitken, R. y Fisher, H. (1994) Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. Bioessays 16, 259-267.

- Aitken, R., Gordon, E., Harkiss, D., Twigg, J., Milne, P., Jennings, Z. y Irvine, D. (1998) Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol. Reprod.* . 59, 1037-1046.
- Aitken, R.; Buckingham, D. y West, K. (1992) Reactive oxygen species and human spermatozoa: analysis of the cellular mechanisms involved in luminol- and lucegenin- dependent chemiluminescence. *Journal of Cellular Physiology* 151, 466-477
- Aitken, R.; Buckingham, D.; Harkiss, D.; Paterson, M.; Fisher, H. y Irvine, D. (1996). The extragenomic action of progesterone on human spermatozoa is influenced by redox regulated changes in tyrosine phosphorylation during capacitation. *Mol Cell Endocrinol* 117, 83-93
- Aitken, R.; Clarkson, J. y Fishel, S. (1989). Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. *Biol. Reprod.* 40, 183-197.
- Aitken, R.J, Paterson, M., Fisher, H., Buckingham, D.W. y van Duin, M. (1995) Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. *Journal of Cell Science* 108, 2017-2025.
- Álvarez, J. y Storey, B. (1989) Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete Research*. 23, 77-90.
- Álvarez, J. y Storey, B. (1992) Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a model of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *J Androl.* 13, 232-241
- Askari, H., Check, J., Peymer, N. y Bollendorf, A. (1994) Effect of natural antioxidants tocopherol and ascorbic acids in maintenance of sperm activity during freeze-thaw process. *Archives of Andrology* 33, 11-15.
- Ax, R., Dally, M., Didion, B., Lenz, R., Love, C., Varner, D., Háfiez, B. y Bellin, M. (2000) Semen evaluation. En: Háfiez, E.S.E. and Háfiez. B (eds),

Reproduction in farm animals, 7<sup>th</sup> edition. Lippincott Williams & Wilkins Company, Philadelphia, pp 365-375.

- Baldi, E., Luconi, M., Bonaccorsi, L., Krausz, C. y Forti, G. (1996). Human sperm activation during capacitation and acrosome reaction: role of calcium, protein phosphorylation and lipid remodelling pathways. *Frontiers in Bioscience* 1, d189-205
- Ball, B. y Vo, A. (2002) Determination of lipid peroxidation in equine spermatozoa during cooled storage. *Theriogenology* 57, p 367 (abstract).
- Ball, B., Gravance, C., Medina, V., Baumber, J. y Liu, I. (2000) Catalase activity in equine semen. *American Journal of Veterinary Research* 61, 1026-1030.
- Ball, B., Vo, A. y Baumber, J. (2001a) Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. *American Journal of Veterinary Research* 62, 508-515.
- Ball, B.A., Medina, V., Gravance, C.G. y Baumber, J. (2001b) Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5 °C. *Theriogenology* **56**, 577-589.
- Barrios, B., Pérez-Pé, R., Gallego, M., Tato, A., Osada, J., Muño-Blanco, T. y Cebrián-Pérez, J. (2000) Seminal Plasma Proteins Revert the Cold-Shock Damage on Ram Sperm Membrane. *Biol. Reprod.* 63, 1531–1537.
- Baumber, J., Vo, A., Sabeur, K. y Ball, B. (2002) Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. *Theriogenology* 57, 1025-1033.
- Baumber, J.; Ball, B.; Linfor, J. y Meyers, S. (2003) Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *J Androl.* 24, 621-628.
- Bazer, F.; Geisert, R. y Zavy, M. (2000) Fecundation, excision and implantation. En: Háfiez, E.S.E. and Háfiez. B (eds), *Reproduction in farm animals*, 7<sup>th</sup> edition. Lippincott Williams & Wilkins Company, Philadelphia, pp 172-181.
- Bedford, J. (1983) significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals. *Biol. Reprod.* 28, 108-120.

- Bell., M., Wang, R., Hellstrom, W. y Sikka, S. (1993) Effect of cryoprotective additives and cryopreservation protocol on sperm membrane lipid peroxidation and recovery of motile human sperm. *J Androl.* 14, 472-478.
- Benoff, S. (1993) The role of cholesterol during capacitation of human spermatozoa. *Human Reproduction* 8, 2001-2008.
- Bilodeau, J., Blanchette, S., Cormier, N. y Sirard, M. (2002) Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender. Protection by piruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. *Theriogenology* 57, 1105-1122.
- Bilodeau, J., Blanchette, S., Gagnon, C. y Sirard, M. (2001) Thiols prevent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology* 56, 275-286.
- Bize, I., Santander, G., Cabello, P., Driscoll, D. y Sharpe, C. (1991) Hydrogen peroxide is involved in hamster sperm capacitation in vitro. *Biol. Reprod.* 44, 398-403.
- Boiso, I. (2001) Principios básicos de criobiología. *Revista Iberoamericana de Fertilidad.* 18, 127-131.
- Byrne, G., Lonergan, P., Wade, M., Duffy, P., Donovan, A., Hanrahan, J. y Boland, M. (2000) Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility in vivo and in vitro. *Anim. Repro. Sci.* 62, 265-275.
- Chatterjee, S. y Gagnon, C. (2001) Production of reactive species by spermatozoa undergoing cooling, freezing and thawing. *Molecular Reproduction and Development* 59, 451-458.
- Chatterjee, S., de Lamirande, E. y Gagnon, C. (2001) Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione. *Molecular Reproduction and Development* 60, 498-506.
- Chihuailaf, R., Contreras, P. y Wittwer, F. (2002) Patogénesis del estrés oxidativo: Consecuencias y evaluación en salud animal *Vet. Méx.* 33, 265-283

- Coy, P. (1995a) Reproducción en ovejas y cabras. En: Garcia, A.; Castejón, F.; de la Cruz, L.; Gonzalez, J.; Murillo, M. y Salido, G. (eds), Fisiología Veterinaria. Mc Graw-Hill – Interamericana, Madrid, pp 937-950.
- Coy, P. (1995b) Fisiología de la gestación. En: Garcia, A.; Castejón, F.; de la Cruz, L.; Gonzalez, J.; Murillo, M. y Salido, G. (eds), Fisiología Veterinaria. Mc Graw-Hill – Interamericana, Madrid, pp 861-874.
- Curry, M. (2000) Criopreservation of semen from domestic livestock. *Reviews of Reproduction*. 5, 46-52.
- Curry, M. y Watson, P. (1994) Osmotic effects on ram and human sperm membranes in relation to thawing injury. *Cryobiology* 31, 39-46.
- Darszon, A., Labarca, P., Nishigaki, T. y Espinosa, F. (1999) Ion Channels in Sperm Physiology. *Physiological Reviews*. 79, 481-510.
- Davis, B. (1981) Timing of fertilization in mammals: Sperm cholesterol/phospholipid ratio as a determinant of the capacitation interval *Cell Biology* Vol. 78, No. 12, pp. 7560-7564.
- De Lamirande, E. y Gagnon, C. (1993) Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. *Free Radical Biology and Medicine* 14, 157-166.
- De Lamirande, E., Jiang, H., Zini, A., Kodama, H. y Gagnon, C. (1997) Reactive oxygen species and sperm physiology *Reviews of Reproduction* 2, 48-54
- De Lamirande, E., Tsai, C., Harakat, A. y Gagnon, C. (1998) Involvement of reactive oxygen species in human sperm acrosome reaction induced by A23187, lysophosphatidylcholine, and biological fluid ultrafiltrates. *J Androl.* 19, 585-594.
- De las Heras, M., Valcárcel, A. y Pérez, L. (1997) In vitro capacitating effect of gamma-aminobutyric in ram spermatozoa. *Biol Reprod* 56: 964-968.
- De Leeuw, F., De Leeuw, A., Den Daas, H., Colenbrader, B. y Werkleij, A. (1993) Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing



compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology* 30, 32-44.

- Didion, B., Dabirsky, J., Giles, J. y Graves, C. (1989) Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. *Gamete Research*. 22, 51-57.
- Donoghue, A.M. y Donoghue, D.J. (1997) Effects of water- and lipid-soluble antioxidants on turkey sperm viability, membrane integrity, and motility during liquid storage. *Poultry Science* **76**, 1440-1445.
- El-Alamy, M. y Foote, R. (2001) Freezability of spermatozoa from Finn and Dorset rams in multiple semen extenders. *Anim. Repro. Sci.* 65, 245-254.
- Evenson, D., Larson, K. y Jost, L. (2002) Sperm chromatin structure assay: Its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl.* . 23, 25-43.
- Fiser, P. y Fairfull, R. (1986) The effects of rapid cooling (cold shock) of ram semen, photoperiod, and egg yolk in diluents on the survival of spermatozoa before and after freezing. *Cryobiology* 23, 518-524.
- Foote, R., Brockett, C. y Kaproth, M. (2002) Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. *Anim. Repro. Sci.* 71, 13-23.
- Foote, R.; Chen, Y.; Brockett, C. y Kaproth, M. (1993) Fertility of bull spermatozoa frozen in whole milk extender with trehalosa, taurine, or blood serum. *J. Dairy Sci.* 76, 1908-1913.
- Fridovich, I. (1998) Oxygen toxicity: a radical explanation. *The Journal of Experimental Biology* 201, 1203-1209.
- Fuchs, J., Thiele, J. y Ochsendorf, F. (1997) Oxidants, antioxidants and oxidative injury. En: Ochsendorf, F. and Fuchs, J (eds), *Oxidative stress in male infertility*, Michael Itschert, Gardez! Verlag, Germany, pp 21-40.
- García, J. y Vila, L. (1984) Criopreservadores: concepto y manejo. *Biología y Clínica Hematológica* 6, 219-225.

- Garner, D. y Háf  ez, E. (2000) Spermatozoa and Seminal Plasma. En: Háf  ez, E.S.E. and Háf  ez. B (eds), Reproduction in farm animals, 7<sup>th</sup> edition. Lippincott Williams & Wilkins Company, Philadelphia, pp 96-109.
- Gavella, M. y Lipovac, V. (1992) NADH-dependent oxido-reductase (diaphorase) activity and isozyme pattern of sperm in infertile men. Archives of Andrology 28, 135-141.
- Gil, J., Rodríguez-leazoqui, M., Lundeheim, N., S  derquist, L. y Rodríguez-Martínez, H. (2003a) Fertility of ram semen frozen in Bioexcell   and used for cervical artificial insemination. Theriogenology 59, 1157-1170.
- Gil, J., S  derquist, L. y Rodriguez-Martínez, H. (2000) Influence of centrifugation and different extenders on post-thaw sperm quality of ram semen. Theriogenology 54, 93-108.
- Gil. J., Lundeheim, N., S  derquist, L. y Rodríguez-Martínez, H. (2003b) Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. Theriogenology 59, 1241-1255.
- Gillan, L., Evans, G. y Maxwell, W.M. (1997) Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. Reprod Fertil Devel. 9, 481-487.
- Grossmann, M., Santal  , J. (1991). Aspectes te  rics de la congelaci   de g  metes i d'embrions. Treb Soc Cat Biol. 42:87-108.
- Guyton, A.; Hall, J. (2000) Tratado de Fisiología Medica. Mc Graw-Hill – Interamericana de España, Madrid. 10<sup>ma</sup> edición, pp 1280.
- H  f  ez, E. (2000) Preservation and cryopreservation of gametes and embryos. En: H  f  ez, E.S.E. and H  f  ez. B (eds), Reproduction in farm animals, 7<sup>th</sup> edition. Lippincott Williams & Wilkins Company, Philadelphia, pp 431-442.
- Herrero, M., De Lamirande, E. y Gagnon, C. (1999) Nitric oxide regulates human sperm capacitation and protein-tyrosine phosphorylation in vitro. Biol. Reprod. 61, 575-581.
- Holt, W. (2000) Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. Theriogenology 53, 47-58.
- Hoskins, D. y Casillas, E. (1973). Function of cyclic nucleotides in mammalian

- spermatozoa. En: Handbook of Physiology, Section 7, Endocrinology, Vol. V, Male Reproductive System. R.O. Greep y E.B. Astwood (eds.). Washington D.C., American Physiological Society, pp. 453-460.
- Irvine, S. (1996) Glutathione as a treatment for male infertility. *Reviews of Reproduction* 1, 6-12.
  - Jones, R. y Mann, T. (1977) Damage to ram spermatozoa by peroxidation of endogenous phospholipids. *J Reprod Fertil* 50, 261-268.
  - Kehrer, J. (1993) Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol.* 23:21-48.
  - Kumar, S., Millar, J. y Watson, P. (2003) The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. *Cryobiology* 46, 246-253.
  - Kusakabe, H.; Szczygiel, M.; Whittingham, D. y Yanagimachi, R. (2001) Maintenance of genetic integrity in frozen and freeze-dried mouse spermatozoa. *PNAS* . 98, 13501–13506.
  - Langlais, J. y Roberts, K. (1985) A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosomal reaction of mammalian spermatozoa. *Gamete Research* 12, 183-224.
  - Lasso, J., Noiles, E., Álvarez, J. y Storey, B. (1994) Mechanism of superoxide dismutase loss from human sperm cells during cryopreservation. *J Androl.* 15, 255-265.
  - Lewis, S., Sterling, E., Young, I. y Thompson, W. (1997) Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. *Fertility and Sterility* 67, 142-147.
  - Luo, J. (2001) Nitroxides-metal-independent SOD mimics. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Free radical and Radiation Biology Program. The University of Iowa.
  - Mann, T. (1975). Biochemistry of semen. En: Handbook of Physiology, Section 7, Endocrinology, Vol. V, Male Reproductive System. R.O. Greep y E.B. Astwood (eds.). Washington, DC, American Physiological Society.

- Mann, T. and Lutwak-Mann, C. (1981). Male Reproductive Function and Semen. New York, Springer- Verlag.
- Mara, L., Accardo, C., Dattena, M., Branca, A., Casu, S. y Cappai, P. (2002) Efecto de un antioxidante en la conservación de semen ovino. Producción Ovina y Caprina. N°XXVII, SEOC, 1059-1065. España.
- Mara, L., Accardo, C., Pilichi, S., Dattena, M., Chessa, F., Chessa, B., Branca, A. y Cappai, P. (2005) Benefits of TEMPOL on ram semen motility and in vitro fertility: a preliminary study. Theriogenology 63, 2243–2253.
- Martínez, P. y Morros, A. (1996) Membrane lipid dynamics during human sperm capacitation. Frontiers in Bioscience 1, 103-117.
- Matés, J. y Sánchez-Jiménez, F. (1999) Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. Frontiers in Bioscience 4, 339-345.
- Maxwell, W. y Watson, P. (1996) Recent progress in the preservation of ram semen. Anim. Repro. Sci. 42, 55-65.
- Mayes, P. (1997a) Oxidación biológica. En: Murray, R., Granner, D., Mayes, P. y Rodwell, V. (eds), Bioquímica de Harper, 24ª edición. Editorial Manual Moderno, Mexico, D.F., Mexico. pp 143-150.
- Mayes, P. (1997b) Estructura y función de las vitaminas liposolubles. En: Murray, R., Granner, D., Mayes, P. y Rodwell, V. (eds), Bioquímica de Harper, 24ª edición. Editorial Manual Moderno, Mexico, D.F., Mexico. pp 723-734.
- Mazur, P. (1984) Freezing of living cells: mechanism and implications. The American Journal of Physiology 247, C125-142.
- Medeiros, C., Forell, F., Oliveira, A. y Rodrigues, J. (2002) Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better?. Theriogenology 57, 327-344.
- Mitchell, J., Samuni, A., Krishna, M., Degraat, W., Ahn, M., Samuni, U. y Russo, A. (1990) Biologically active metal-independent superoxide dismutase mimics. Biochemistry 29, 2802-2807.
- Molinia, F., Evans, G. y Maxwell, W. (1994a) Incorporation of penetrating cryoprotectants in diluents for pellet-freezing ram spermatozoa. Theriogenology 42, 849-858.

- Molinia, F., Evans, G., Quintana Casares, P. y Maxwell, W. (1994b) Effect of monosaccharides and disaccharides in Tris-based diluent on motility, acrosome integrity and fertility of pellet frozen ram spermatozoa. *Anim. Repro. Sci.* 36, 113-122.
- Morani, E.; Roncoletta, M.; Anciotto, K.; Franceschini, P. y Tedesco, A. (2004) Production of reactive oxygen specie in bovine semen after freezing and thawing. 15<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction, Porto Seguro, Brazil. 474p.
- Ochsendorf. F., Thiele, J. y Fuchs, J. (1997) Antioxidants in germinal epithelium, spermatozoa and seminal plasma. En: Ochsendorf, F.R. and Fuchs, J (eds), *Oxidative stress in male infertility*, Michael Itschert, Gardez! Verlag, Germany, pp 85-128.
- Offer, T., Mohsen, M. y Samuni, A. (1998). An SOD-mimicry mechanism underlies the role of nitroxides in protecting papain from oxidative inactivation. *Free Radical Biology and Medicine* 25, 832-838
- O'Flaherty, C., Beconi, M. y Beorlegui, N. (1997) Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa. *Andrologia* 29, 269-275.
- O'Flaherty, C., Beorlegui, N. y Beconi, M. (1999) Reactive oxygen species requirements for bovine sperm capacitation and acrosome reaction. *Theriogenology* 52, 289-301.
- Ollero, M., Blanco, T., Lopez-Pérez, M. y Cevrian-Pérez, J. (1996) Surface changes associated with ram sperm cryopreservation revealed by counter-distribution in an aqueous two-phase system. Effect of different cryoprotectants. *Journal of Chromatography. B, Biomedical Applications* 17, 157-164.
- Paulenz, H., Söderquist, L., Pérez-Pé, R. y Berg, K. (2002) Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. *Theriogenology* 57, 823-836.

- Pérez, L., Valcárcel, A., De las Heras, M., Moses, D. y Baldassarre, H. (1996) Evidence that frozen/thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation in vitro as assessed by chlortetracycline assay. *Theriogenology* 46, 131-140.
- Quinn, P., White, I. y Cleland, R. (1969) Chemical and ultrastructural changes in ram spermatozoa after washing, cold shock and freezing. *J Reprod Fertil* 18, 209-220.
- Salamon, S. y Maxwell, W. (2000) Storage of ram semen. *Anim. Repro. Sci.* 62, 77-111.
- Saleh, R. y Agarwal, A. (2002) Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *J Androl.* 23, 737-752.
- Sánchez-Partida, L., Setchell, B. y Maxwell, W. (1997). Epididymal compounds and antioxidants in diluents for the frozen storage of ram spermatozoa. *Reprod Fertil Devel.* 9, 689-696.
- Sandoval, R. 2005. Criopreservación de semen ovino empleando diferentes dilutores y combinaciones de agentes crioprotectores permeantes y no permeantes. Tesis para optar el título profesional de médico veterinario. Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú, Noviembre.
- Sandoval, R., Ruiz, L., Santiani, A., Coronado, L., Alzamora, C. y Huanca, W. 2005. Criopreservación de semen ovino con agentes crioprotectores permeante y no permeantes. XXV Reunión Científica Anual de la Sociedad Chilena de Producción Animal. Temuco, Chile, Octubre.
- Sanocka, D. y Kurpysz, M. (2004) Reactive oxygen species and sperm cells *Reproductive Biology and Endocrinology* 2, 12-19.
- Santiani, A. (2003) Criopreservación de semen ovino: efecto de la adición de antioxidantes al diluyente. Tesis para obtener el grado de Magíster en Ciencias mención en Biología de la reproducción. Facultad de Medicina-Universidad de la Frontera. Temuco-Chile
- Santiani, A., Sandoval, R., Ruiz, L., Coronado, L. (2004) Estudio de la integridad en espermatozoides de ovino mediante la prueba de estrés

hipoosmótico. XXVII Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal. Piura, Perú, 20 al 24 de setiembre.

- Shivaji, S., Bharagava, P. y Scheit, K. (1984). Immunological identification of seminalplasmin in tissue extracts of sex glands of bull. *Biol. Reprod.* 30, 1237-1241.
- Sikka, S. (1996) Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Frontiers in Bioscience* 1, 78-86
- Tselkas, K., Saratsis, P., Karagianidis, A. y Samoulidis, S. (2000) Extracellular presence of reactive oxygen species (ROS) in fresh and frozen-thawed semen and their effects on some semen parameters. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 107, 69-72.
- Upreti, G., Jensen, K., Munday, R., Duganzich, D., Vishwanath, R. y Smith, J. (1998) Studies on aromatic amino acid oxidase activity in ram spermatozoa: role of piruvate as antioxidant. *Anim. Repro. Sci.* 51, 275-287.
- Vega, A., Treviño, C. y Félix, R. (2002) Canales iónicos y su papel funcional en el espermatozoide. *Avance y Perspectiva* vol. 21, 89-95.
- Venereo, G. (2002) Daño oxidativo, radicales libres y antioxidants. *Revista Cubana de Medicina Militar* 31, 126-133.
- Vila, L. (1984). Principios químico-físicos de la criopreservación de material biológico. *Biol Clin Hematol* 6:227-236.
- Wang, A., Zhang, H., Ikemoto, I., Anderson, D. y Loughlin, K. (1997) Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. *Urology* 49, 921-925.
- Warren, J., Johnson, H. y Ward, P. (1987) Oxygen radicals in cell injury and cell death. *Pathology and Immunopathology Research* 6, 301-315.
- Watson, P. (1975) The interaction of egg yolk and ram spermatozoa studied with a fluorescent probe. *J Reprod Fertil* 42, 105-111.
- Watson, P. (1981) The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5°C by egg-yolk lipoprotein. *J Reprod Fertil* 62, 483-492.

- Watson, P. (2000) The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Anim. Repro. Sci. 60-61, 481-492.
- Watson, P. y Anderson, W. (1983) Influence of butylated hydroxytoluene (BHT) on the viability of ram spermatozoa undergoing cold shock. J Reprod Fertil 69, 229-235.
- Watson, P. y Martin, I. (1975) Effects of egg yolk, glycerol and the freezing rate on the viability and acrosomal structures of frozen ram spermatozoa. Australian Journal of Biological Science 28, 153-159.
- White, I. (1980) Secretion of the male reproductive tract and seminal plasma. En: Reproduction in Farm Animals. 4<sup>th</sup> ed. E.S.E. Hafez (ed.). Philadelphia, Lea & Febiger.
- Zar, J. (1999) Biostatistical Analysis, 4th ed. Prentice Hall, New Jersey.



## VII. APÉNDICES

### APÉNDICE 1

#### Preparación del diluyente descrito por Aisen y col. (2000)

##### Primera Fracción (aproximadamente 300 mOsm y pH 6.8)

Tris	27.1 g	Amresco (826)
Ácido Cítrico	14.0 g	Sigma (C0759)
Fructosa	10.0 g	Labgaud (7756)
Yema de huevo	100 mL.	
Agua bidestilada csp.	1000 mL.	Trifarma

##### Segunda Fracción (aproximadamente 1600 mOsm y pH 6.8):

Glicerol	60 mL	Merck (1.04094)
EDTA	1.5 g	Sigma (ED4S)
Trehalosa	76.0 g	Merck (1.08216)
Primera fracción csp	1000 mL	

### APÉNDICE 2

#### Preparación del medio base

##### Medio base:

Tris	27.1 g	Amresco (826)
Ácido Cítrico	14.0 g	Sigma (C0759)
Fructosa	10.0 g	Labgaud (7756)
Agua bidestilada csp.	1000 mL.	Trifarma